



**FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA**

**Die Rolle des Komplementaktivators FHR5 in der
Immunhomöostase und bei der Pathogenese der
Nierenerkrankung C3-Glomerulopathie**

—

wenn der Freund zum Gegner wird

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M. Sc. Ramona Rudnick

geboren am 12. Januar 1991 in Naila

Gutachter

1. Prof. Dr. Peter Zipfel
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung in Infektionsbiologie (Hans-Knöll-Institut)
Abteilung Infektionsbiologie
Adolf-Reichwein-Straße 23
07745 Jena

2. PD Dr. Christian Kosan
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Zentrum für Molekulare Biomedizin (CMB)
Professur für Biochemie
Hans-Knöll-Straße 2
07745 Jena

3. Prof. Dr. Christian Kurts
Universitätsklinikum Bonn
Institut für Experimentelle Immunologie
Venusberg-Campus 1
53127 Bonn

„Es irrt der Mensch so lang er strebt.“

Johann Wolfgang von Goethe
Faust I, Vers 317

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	IX
Summary.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem.....	1
1.1.1 Die angeborene Immunantwort	1
1.1.2 Die adaptive Immunantwort.....	2
1.2 Das Komplementsystem	4
1.2.1 Überblick über die Komplementkaskade	5
1.2.2 Initiation der Kaskade.....	6
1.2.3 C3-Konvertase	8
1.2.4 C5-Konvertase	8
1.2.5 Terminaler Weg	8
1.3 Regulation des Komplementsystems	9
1.3.1 Faktor H/FHR Proteinfamilie	9
1.3.2 Faktor H – Inhibitor des Alternativen Wegs	11
1.3.3 Faktor H verwandte Proteine (FHRs)	12
1.3.4 FHR5	13
1.4 Komplement und oxidationsspezifische Epitope.....	15
1.5 Die Niere – Zielorgan komplementvermittelter Erkrankungen.....	16
1.5.1 Komplementassoziierte Nierenerkrankungen	16
1.5.2 Anatomie der Niere	17
1.5.3 Der Glomerulus.....	17
1.6 C3-Glomerulopathie	19
1.6.1 Genetische Veränderungen im <i>FH/CFHR</i> Gencluster als Ursache für C3-Glomerulopathie	20
2 Fragestellung	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Material	23
3.2 Methoden.....	30
3.2.1 Primärzellen	30
3.2.2 Zelllinien.....	30

3.2.3	Transformation von <i>E.coli</i> Zellen und DNA-Aufreinigung.....	31
3.2.4	Transiente Transfektion von HEK293 Zellen und Expression von FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten	31
3.2.5	Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie	31
3.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
3.2.7	Western Blot	32
3.2.8	Silberfärbung.....	33
3.2.9	<i>Biolayer Interferometry</i> (BLItz®).....	33
3.2.10	<i>CellTiter-Blue®</i> -Assays.....	33
3.2.11	ELISA-Techniken	34
3.2.12	CEWA – Kombinierte ELISA und Western Blot Analysen.....	37
3.2.13	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie	38
3.2.14	Durchflusszytometrische Analysen.....	39
3.2.15	Untersuchung von Nierenbiopsien	41
3.2.16	Statistische Auswertung.....	41
4	Ergebnisse	42
4.1	FHR5 ist in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert und im Serum erhöht ..	42
4.2	FHR5 bindet über oxidationsspezifische MAA-Epitope an modifizierte Zellen und aktiviert das Komplementsystem auf MAA-exponierenden Oberflächen	43
4.2.1	Expression von FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten im HEK293- Zellsystem.....	43
4.2.2	FHR5 akkumuliert an schadenassoziierten Bereichen modifizierter Zellen	44
4.2.3	Schadenassoziierte Bereiche modifizierter Zellen exponieren verstärkt oxidationsspezifische MAA-Epitope	45
4.2.4	FHR5 interagiert mit oberflächengebundenen MAA-Epitopen	47
4.2.5	FHR5 inhibiert die Kofaktoraktivität von Faktor H auf MAA- exponierenden Oberflächen durch Konkurrenzbindung.....	52
4.2.6	MAA-gebundenes FHR5 aktiviert das Komplementsystem	55
4.3	FHR5 aktiviert das Komplementsystem auf Laminin-521	57
4.3.1	FHR5 bindet über die SCRs 5-7 an Laminin-521	57
4.3.2	FHR5 und Laminin kolokalisieren entlang der glomerulären Basalmembran.....	59
4.3.3	Laminin-521-gebundenes FHR5 aktiviert das Komplementsystem.....	59
4.4	Oberflächengebundenes FHR5 stimuliert die TNF α und hemmt die IL-10 Sekretion von humanen Monozyten	60
4.5	FHR5 verstärkt die Schädigung humaner Mesangialzellen	62
5	Diskussion.....	65

5.1	MAA-Epitope und Laminin tragen zur FHR5 Deposition in Glomeruli von C3G Patienten bei.....	65
5.1.1	FHR5 ist in die Pathogenese von C3G involviert.....	65
5.1.2	Die Rolle von MAA-Epitopen bei der FHR5 Deposition	67
5.1.3	Laminin-521 trägt zur FHR5 Deposition entlang der GBM bei	71
5.2	MAA- und Laminin-gebundenes FHR5 ist funktionell aktiv und steigert die Komplementaktivität	72
5.3	Oberflächengebundenes FHR5 hat einen proinflammatorischen Effekt auf humane Monozyten.....	73
5.4	FHR5 verstärkt bestehende Nierenschäden.....	75
5.5	Die Rolle von FHR5 in der Immunhomöostase und bei der Pathogenese von C3-Glomerulopathie	77
5.6	Relevanz der Ergebnisse für therapeutische Ansätze	81
Anhang.....		i
Literaturverzeichnis		ii
Eigenständigkeitserklärung		xiii
Lebenslauf		xiv
Publikationen, Konferenzbeiträge, Auszeichnungen.....		xv
Danksagung		xvii

Abkürzungsverzeichnis

Wenn möglich, wurde die deutsche Übersetzung für die jeweiligen Abkürzungen verwendet. In Ausnahmefällen wurden die englischen Fachtermini beibehalten. Auf die kursive Schreibweise der englischsprachigen Begriffe wurde im Abkürzungsverzeichnis aus Übersichtsgründen verzichtet.

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BSA	Rinderserumalbumin
C3aR	C3a-Rezeptor
C3G	C3-Glomerulopathie
C5aR	C5a-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CEWA	Kombinierte ELISA und Western Blot Analyse
CRP	C-reaktives Protein
DAMPs	Schadenassoziierte molekulare Muster
DAF	Decay Accelerating Factor
DDD	Dense Deposit Disease
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EZM	Extrazelluläre Matrix
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
fB	Faktor B
fD	Faktor D
fH	Faktor H
FHL-1	Factor H-like Protein 1
FHR	Faktor H verwandtes Protein
fP	Properdin
FBS	Fötales Rinderserum
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen
hiS	Hitzeinaktiviertes Serum
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen
IC	Isotyp-Kontrolle
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
kb	Kilobasenpaar
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAA	Malondialdehyde-Acetaldehyd
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin

MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MDA	Malondialdehyd
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
NHS	Normales humanes Serum
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
SEs	Oxidationsspezifische Epitope
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTX3	Pentraxin 3
PEI	Polyethylenimin
PRR	Mustererkennungszereptor
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SCR	Short Consensus Repeat
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sh-BSA	Sham treated-BSA
SNP	Einzelnukeotidpolymorphismus
TCC	Terminaler Komplementkomplex
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSR	Thrombospondin Repeats Type I
URD	Urgent Regulation of Damage
Ü.N.	Über Nacht

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Komplementkaskade.	6
Abbildung 2: Faktor H/FHR Proteinfamilie.	10
Abbildung 3: <i>Faktor H/CFHR</i> Genfamilie..	11
Abbildung 4: FHR Proteine.....	12
Abbildung 5: Struktur und Interaktionsdomänen von FHR5..	14
Abbildung 6: Strukturformel eines MAA-Addukts..	16
Abbildung 7: Aufbau eines Glomerulus.	19
Abbildung 8: Moderne Klassifizierung von C3-Glomerulopathie..	20
Abbildung 9: Hybridprotein aus FHR2 und FHR5 (FHR2 ₁₋₂ -FHR5)..	21
Abbildung 10: FHR5 ist in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert und im Serum erhöht.	43
Abbildung 11: Nachweis von rekombinantem FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten.	44
Abbildung 12: FHR5 akkumuliert an spezifischen Bereichen geschädigter Zellen.	45
Abbildung 13: MAA-Epitope werden an geschädigten Stellen der Zelloberfläche exponiert..	46
Abbildung 14 MAA-Epitope werden auf nekrotischen HUVECs und primären humanen Mesangialzellen exponiert.....	47
Abbildung 15: FHR5 bindet mit nanomolarer Affinität an MAA-Epitope.....	49
Abbildung 16: FHR2 ₁₋₂ -FHR5 bindet FHR2-unabhängig stärker an MAA-BSA als FHR5.....	50
Abbildung 17: FHR5 und FHR2 ₁₋₂ -FHR5 aus humanem Serum binden an MAA-BSA.	51
Abbildung 18: Die Vorinkubation mit MAA-BSA bewirkt eine Reduktion der FHR5 Bindung an nekrotische Zellen.....	52
Abbildung 19: FHR5 konkurriert mit Faktor H um die Bindung an MAA-BSA.....	53
Abbildung 20: FHR5 reduziert die Kofaktoraktivität von Faktor H auf MAA-exponierenden Oberflächen.....	55
Abbildung 21: MAA-gebundenes FHR5 verstärkt die Deposition von C3-Aktivierungsfragmenten..	56
Abbildung 22: MAA-gebundenes FHR5 verstärkt die C3a Freisetzung.....	57
Abbildung 23: FHR5 bindet über die Mittelregion an Laminin-521.	58
Abbildung 24: FHR5 und Laminin kolokalisieren entlang der glomerulären Basalmembran.	59
Abbildung 25: Laminin-gebundenes FHR5 verstärkt die C3-Fragmentdeposition.	60
Abbildung 26: Oberflächengebundenes FHR5 wirkt proinflammatorisch auf humane Monozyten.....	61

Abbildung 27: FHR5 unterstützt die Phagozytose modifizierter Zellen.....	62
Abbildung 28: FHR5 verstärkt die NHS-induzierte Schädigung von Mesangialzellen. .	63
Abbildung 29: NHS schädigt humane Mesangialzellen und induziert die Exposition von MAA-Epitopen.....	64
Abbildung 30: Funktion von FHR5 in der Immunhomöostase.	78
Abbildung 31: Rolle von FHR5 bei der Pathogenese von C3G.....	80
 Ergänzende Abbildung 1: FHR5 bindet über MAA-Epitope an veränderte Zellen.	i

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	23
Tabelle 2: Geräte und Software.....	23
Tabelle 3: Kommerzielle Kits	25
Tabelle 4: Nährmedien	25
Tabelle 5: Primärantikörper/-seren	25
Tabelle 6: Proteine	26
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	26
Tabelle 8: Sekundäntiseren und Farbstoffe	27
Tabelle 9: Seren.....	27
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialen.....	27
Tabelle 11: Zellkulturmedien/-lösungen	28
Tabelle 12: Zelllinien und Buffy-Coats	28

Zusammenfassung

Ein intaktes Komplementsystem ist als zentraler Teil der angeborenen Immunantwort essentiell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Die selbstamplifizierende Kaskade muss jedoch engmaschig reguliert werden, um den Organismus einerseits effizient vor pathogenen Erregern und der Schädigung durch körpereigenes modifiziertes Material zu verteidigen, aber andererseits um gesundes Gewebe zu schützen. Zu diesem Zweck exprimiert der menschliche Körper eine Vielzahl an Proteinen, welche die Kaskade auf unterschiedlichen Ebenen regulieren. Ein wichtiges Regulatorprotein ist der Komplementaktivator Faktor H verwandtes Protein 5 (FHR5). Genetische Veränderungen im *CFHR5* Gen wurden bereits mit der schwerwiegenden Nierenkrankheit C3-Glomerulopathie (C3G) assoziiert; jedoch sind sowohl die exakte Rolle von FHR5 bei der Pathogenese der Erkrankung als auch die physiologische Funktion des Proteins nicht vollständig verstanden. Ziel dieses Promotionsprojekts war es daher, ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise von FHR5 zu erlangen und zu untersuchen, wie FHR5 in die Pathogenese von C3G involviert ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass FHR5 in geschädigten Glomeruli von C3G Patienten abgelagert und die FHR5 Konzentration im Serum bei C3G erhöht ist. FHR5 bindet an oxidationsspezifische MAA-Epitope, die auf veränderten Mesangialzellen exponiert werden sowie an die extrazelluläre Matrix-Komponente Laminin-521 entlang der glomerulären Basalmembran. Ist FHR5 an MAA-Epitope bzw. Laminin gebunden, aktiviert es das Komplementsystem und initiiert die Spaltung des Komplementproteins C3. Allerdings konkurriert FHR5 bei der Bindung an MAA-Epitope mit dem Komplementinhibitor Faktor H und reduziert so dessen Kofaktoraktivität auf der oxidationsspezifischen Oberfläche. Unter physiologischen Bedingungen könnte dieses Gleichgewicht der gebundenen Modulatoren lokale Prozesse steuern. Zusätzlich moduliert oberflächengebundenes FHR5 den zellulären Teil des angeborenen Immunsystems. FHR5 induziert in Monozyten die Sekretion von proinflammatorischem TNF α , hemmt die Freisetzung von antiinflammatorischem IL-10 und unterstützt die Phagozytose apoptotischen Materials. Untersuchungen an primären Mesangialzellen zeigen weiterhin, dass FHR5 keinen Einfluss auf intakte Nierenzellen hat und per se keine Zellschäden induziert. Sind die Zellen jedoch bereits vorgeschädigt, verstärkt FHR5 die Schädigung.

Anhand dieser Daten wird postuliert, dass FHR5 unter physiologischen Bedingungen an der raschen Eliminierung von modifiziertem körpereigenem Material beteiligt ist. Das präzise abgestimmte Gleichgewicht der Komplementregulatoren FHR5 und Faktor H bei der Bindung an lokal begrenzte, veränderte Oberflächen ist bei der Aufrechterhaltung

der Immunhomöostase essentiell. Kommt es jedoch unter pathophysiologischen Umständen bei C3G Patienten zur Akkumulation von MAA-Epitopen und zur Exposition von Laminin-521 im Glomerulus, wird FHR5 dort abgelagert, verursacht eine übermäßige Komplementaktivierung sowie proinflammatorische Bedingungen und induziert weitere renale Schäden.

Summary

The intact complement system is a central part of the innate immune response and crucial to maintain immune homeostasis. In order to defend the human body against pathogenic microbes or modified endogenous material and to protect healthy tissue, the self-amplifying cascade needs to be tightly regulated. Due to this, humans express plenty of complement regulatory proteins, which act at different levels. One important regulatory protein is the complement activator Factor H Related Protein 5 (FHR5). Mutations within the *CFHR5* gene are associated with the devastating kidney disorder C3-glomerulopathy (C3G). However, the exact role of FHR5 in the pathogenesis of C3G as well as the physiological function of FHR5 remains unknown. Thus, the aim of this project was to shed light on the physiological function of FHR5 and to investigate how FHR5 is involved in the pathogenesis of C3G.

The present study shows that FHR5 is deposited in glomeruli of C3G patients and that the FHR5 concentration in serum is elevated in C3G. FHR5 binds to oxidation specific Malondialdehyde-Acetaldehyde (MAA)-epitopes which become exposed on the surface of damaged mesangial cells. Furthermore, FHR5 binds to the extracellular matrix component Laminin-521 at the glomerular basement membrane. MAA- and Laminin-bound FHR5 activates complement and increases the cleavage of the central complement protein C3. However, FHR5 competes with the complement inhibitory protein Factor H for MAA-epitope binding and reduces its cofactor activity on the oxidation specific surface. Under physiological conditions, the balance of bound FHR5 and Factor H could control local processes. In addition, surface bound FHR5 modulates cellular parts of the innate immune system. FHR5 induces the secretion of proinflammatory TNF α by monocytes and reduces the generation of antiinflammatory IL-10. Moreover, FHR5 supports the phagocytosis of apoptotic cells by monocytes. Experiments with primary mesangial cells show that FHR5 does not influence the viability of intact renal cells. However, if the cells are already harmed FHR5 increases the cell damage.

In conclusion, these data indicate that FHR5 is involved in the rapid elimination of modified endogenous material. The precise balance of FHR5 and Factor H binding to locally generated modified self-surfaces is essential in maintaining the immune homeostasis. In contrast, under pathophysiological conditions in C3G, MAA-epitopes accumulate and Laminin-521 becomes exposed within the glomerulus. As a consequence, FHR5 is deposited at these sites, triggers excessive complement activation and proinflammatory conditions and increases renal injury.

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das menschliche Immunsystem (lat. *Immunis* = frei, rein), das im Volksmund häufig als „Wächter der Gesundheit“ bezeichnet wird, ist ein komplexes und lebenswichtiges Netzwerk aus Organen, Geweben, Zellen und humoralen Komponenten, das den Organismus hocheffizient vor exogenen und endogenen Bedrohungen schützt. Ein solches System wird benötigt, da der Mensch in ständigem Austausch mit seiner Umwelt steht und somit kontinuierlich einer Vielzahl an potentiell krankmachenden Mikroorganismen, Schadstoffen und Toxinen ausgesetzt ist. Darüber hinaus entsteht innerhalb des Organismus permanent eine enorme Menge an verändertem Material, welches erkannt und unverzüglich eliminiert werden muss. Hierzu zählen beispielsweise apoptotische oder maligne Zellen sowie Zelldebris. Intakte und gesunde Körperstrukturen müssen allerdings zeitgleich effektiv vor der Erkennung durch das Immunsystem geschützt werden (1-5).

Klassischerweise unterscheidet man bei der Betrachtung des humanen Immunsystems zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Das Zusammenwirken beider Systeme ist jedoch essentiell, um eine potente Immunantwort auszulösen und die Integrität des Organismus aufrechtzuerhalten (6).

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch ältere Teil des Immunsystems und bereits in primitiven multizellulären Organismen vorhanden. Es repräsentiert die erste immunologische Verteidigungslinie und besteht aus mehreren unterschiedlichen Komponenten. Zunächst bilden mechanische und chemische Barrieren einen effektiven Schutz gegen das Eindringen von Mikroorganismen. Zu diesen Barrieren zählen unter anderem intakte Epithelschichten, deren Zellen durch Zell-Zell-Kontakte (z.B. *tight junctions*) eng verbunden sind, sowie Mukusschichten, welche das Adhären von Mikroorganismen verhindern (7-9).

Werden diese anatomischen Barrieren dennoch von Pathogenen überwunden, so verfügt das angeborene Immunsystem über ein Repertoire an zellulären und humoralen Komponenten, welche die Erreger frühzeitig eliminieren und den Organismus auf diese Weise vor schwerwiegenden Infektionen schützen. Der zelluläre Teil umfasst mehrere Zelltypen, die durch die Expression von, in der Keimbahn kodierten, Mustererkennungsrezeptoren (PRR) in der Lage sind, konservierte Strukturen auf der

Erregeroberfläche (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, PAMPs) zu erkennen. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen sowie natürliche Killerzellen. Da PAMPs Mikroorganismen-spezifisch vorkommen und somit im Wirtsorganismus nicht präsent sind, führt die Detektion solcher Muster zur Aktivierung von Signalkaskaden und zum Auslösen einer Immunantwort. So führt die Stimulation von PRRs zur Phagozytose-Induktion bei Phagozyten, zur Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen oder zur Sekretion von Zyto- und Chemokinen (1, 2, 7, 10). Neben körperfremden PAMPs existieren auch endogene Moleküle (schadenassoziierte molekulare Muster, DAMPs), die als Antwort auf Zelltod oder -stress aus dem Zellinneren freigesetzt werden und zur Aktivierung von PRRs führen. Dies gewährleistet die Beseitigung von apoptotischem und nekrotischem Zellmaterial und ist daher für die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase von zentraler Bedeutung (11, 12).

Eine essentielle Komponente des humoralen Teils des angeborenen Immunsystems ist das sogenannte Komplementsystem. Hierbei handelt es sich um eine komplexe Proteinkaskade, deren Aktivierung eine Vielzahl von Effektorfunktionen nach sich zieht und somit sowohl zur Abwehr von eingedrungenen Pathogenen als auch zur Beseitigung von modifiziertem körpereigenem Material beiträgt (13). Die genaue Funktionsweise des Komplementsystems wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit beschrieben.

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem hat sich gegenüber dem angeborenen Immunsystem evolutionär später entwickelt und ist erst im Laufe der Vertebraten-Entwicklung entstanden. Vorteile des adaptiven Immunsystems sind die hohe Spezifität sowie die Fähigkeit zur Entwicklung des sogenannten immunologischen Gedächtnisses (7). Während alle Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in der Keimbahn kodiert sind, können die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems an das jeweilige Antigen angepasst werden. Dies wird durch komplexe Rekombinationsprozesse von Gensegmenten (somatische oder auch V(D)J Rekombination) während der Lymphozyten-Reifung erreicht. Die Antwort des adaptiven Immunsystems benötigt jedoch im Gegensatz zur unmittelbaren Reaktion der angeborenen Immunantwort mehrere Tage (2, 9, 14).

Wie beim angeborenen Immunsystem kann auch beim adaptiven Immunsystem zwischen zellulärem und humoralem Teil unterschieden werden. Im Zentrum der zellulären Antwort stehen die T- und B-Lymphozyten, auch T- und B-Zellen genannt, wohingegen

der humorale Teil von Antikörpern (Immunglobulinen) vermittelt wird. Diese werden von Plasmazellen sezerniert (6, 9).

Wie eingangs erwähnt, arbeiten das angeborene und das adaptive Immunsystem synergistisch. So werden naive T-Lymphozyten zu T-Effektorzellen aktiviert, indem sie in sekundären lymphatischen Organen über den T-Zell-Rezeptor mit dem jeweiligen Antigen in Kontakt kommen. Dies geschieht über die Präsentation des Antigens auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (hauptsächlich dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen). Durch den Antigenkontakt können sich die T-Zellen zu drei wesentlichen Arten von Effektorzellen differenzieren: (1) $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, (2) $CD4^+$ T-Helferzellen und (3) $CD4^+$ regulatorische T-Zellen. Während zytotoxische T-Zellen die Apoptose von virusinfizierten Zellen induzieren, wirken T-Helferzellen, unter anderem durch die Sekretion spezifischer Zytokine, modulierend auf andere Zelltypen wie z.B. B-Zellen oder Makrophagen. Hauptaufgabe der regulatorischen T-Zellen ist die Suppression der Immunantwort; sie nehmen somit eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase ein (1, 9, 15).

Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt vorwiegend über zwei Signale. B-Lymphozyten binden zunächst ein spezifisches Antigen über den oberflächengebundenen B-Zellrezeptor, welcher die membrangebundene Form eines Antikörpers repräsentiert. Anschließend wird das Antigen prozessiert und dessen Fragmente über einen MHC-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Erkennung durch spezifische T-Helferzellen führt letztlich zur B-Zell-Aktivierung (16). Die Aktivierung hat die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu sogenannten Plasmazellen zur Folge, welche als Effektorzellen Antikörper produzieren und sezernieren. Neben der beschriebenen T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung existiert auch eine T-Zell-unabhängige Aktivierung. Diese Art der Aktivierung wird beispielsweise durch bakterielle Antigene wie Lipo-polysaccharide induziert und erfolgt ohne T-Zell-Signal nur über die Kreuzvernetzung der membranständigen B-Zellrezeptoren (1, 2).

Ein Teil der aktivierten B- und T-Lymphozyten differenziert sich zu langlebigen Gedächtniszellen. Bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Antigen differenzieren sich diese unmittelbar zu Effektorzellen und vermitteln auf diese Weise eine langanhaltende Immunität (14).

1.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein zentrales Element der angeborenen Immunantwort und wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Hans Buchner und Jules Bordet als „hitzeempfindlicher Bestandteil“ des Blutplasmas beschrieben. Der Begriff „Komplement“ wurde wenig später von Paul Ehrlich geprägt (17). Das Komplementsystem repräsentiert eine komplexe Proteinkaskade, die sich aus mehr als 60 Komponenten zusammensetzt, welche entweder als lösliche Form im Blut zirkulieren oder membrangebunden auf körpereigenen Zellen lokalisiert sind (13). Die Synthese von zirkulierenden Komplementproteinen erfolgt hauptsächlich durch Hepatozyten in der Leber, jedoch sind auch viele andere Körperzellen wie zum Beispiel Endothel- und Epithel- sowie verschiedene Immunzellen in der Lage, diese zu produzieren (18, 19). Die extrahepatische Produktion von Komplementkomponenten dient höchstwahrscheinlich dazu, auf lokale Anforderungen des jeweiligen Gewebes zu reagieren und damit inflammatorische Prozesse sowie zelluläre Aktivitäten zu regulieren (20).

Heute ist bekannt, dass das Komplementsystem weit mehr als ein hitzeempfindlicher Bestandteil des Plasmas ist, denn es vermittelt einerseits direkte Effektorfunktionen, andererseits nimmt es Einfluss auf andere Komponenten des angeborenen Immunsystems und moduliert die adaptive Immunabwehr (21). Ein intaktes Komplementsystem ist daher für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und zellulären Integrität essentiell.

Die direkten Funktionen des Komplementsystems umfassen einerseits die Eliminierung von Pathogenen durch Zellyse, die Induktion von Entzündungsreaktionen sowie die Unterstützung von Phagozytose-Prozessen und damit die Beseitigung von Pathogenen, Immunkomplexen und modifiziertem körpereigenem Zellmaterial (22). Wie bereits angedeutet, beeinflusst das Komplementsystem zudem die adaptive Immunantwort. So sind beispielsweise dendritische Zellen durch die Sekretion des Komplementmoleküls C3 in die Aktivierung von T-Zellen involviert (23). Die Anaphylatoxine C3a und C5a nehmen außerdem Einfluss auf die Aktivierung und Zytokin-Antwort von T-Lymphozyten, indem sie mit ihrem jeweiligen Rezeptor (C3aR bzw. C5aR) auf der Zelloberfläche interagieren und bestimmte Signalwege induzieren (24). Weiterhin spielen verschiedene Komplementrezeptoren, unter anderem CD46, CD55 und CD59, eine Rolle bei der Regulation von T-Zellen (21, 25-27). Das Komplementsystem ist jedoch nicht nur in die Modulation von T-Zellen involviert, sondern nimmt auch Einfluss auf die B-Zellantwort. So spielt das Komplementprotein C3 eine wichtige Rolle bei der Antikörperproduktion und wird für die Bildung und Aufrechterhaltung von B-Gedächtniszellen benötigt. Weiterhin verstärkt das antigengebundene C3-Aktivierungsfragment C3d das *Signalling* von B-Zellen, indem es mit dem auf B-Zellen exprimierten Komplementrezeptor CR2 (CD21) interagiert und an

der Bildung eines Korezeptor-Komplexes mit CD19 und CD81 beteiligt ist (21, 28, 29). Insbesondere durch die Forschung der letzten zehn Jahre konnte zudem gezeigt werden, dass neben der klassischen Funktion des Komplementsystems als Serumkomponente ein aktives intrazelluläres Komplement (*complosome*) existiert (19, 30-32).

1.2.1 Überblick über die Komplementkaskade

Die Komplementkaskade kann grundsätzlich in vier Ebenen unterteilt werden (Abbildung 1). Zunächst erfolgt die Initiation (1) des Systems über einen der drei Aktivierungswege (Alternativer Weg, Klassischer Weg oder Lektin Weg). Unabhängig des Aktivierungswegs mündet die Komplementkaskade anschließend in die Bildung und Amplifikation des Enzyms C3-Konvertase (2), welches das zentrale Komplementmolekül C3 in die Spaltprodukte C3a und C3b spaltet. Das freigesetzte Anaphylatoxin C3a induziert dabei potente Entzündungsreaktionen, wohingegen C3b zur Opsonisierung von Pathogenen und körpereigenem Zellmaterial führt. Die Produktion von C3b bewirkt außerdem die Bildung des Enzyms C5-Konvertase (3), welches wiederum C5 in das inflammatorisch wirkende Anaphylatoxin C5a sowie C5b spaltet. Die Freisetzung von C5b leitet schließlich den Terminalen Weg (4) ein und dient als Ausgangspunkt für die Synthese des sogenannten Terminalen Komplement Komplex (TCC). Dieser vermittelt die Lyse von Pathogenen durch Bildung einer lytischen Pore auf der Oberfläche (13).

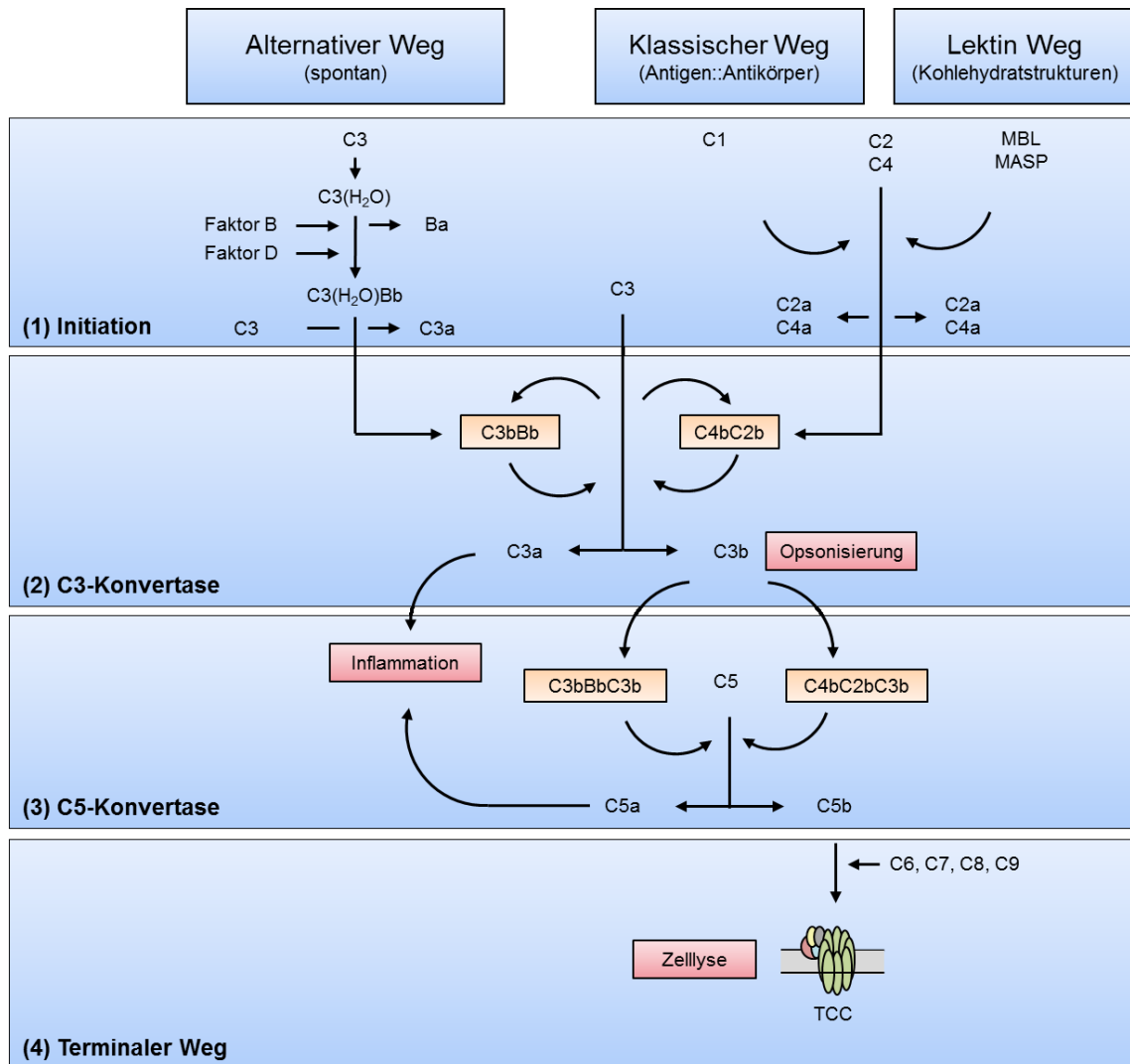


Abbildung 1: Die Komplementkaskade. Das Komplementsystem kann in vier Stufen unterteilt werden. (1) Zunächst erfolgt die Initiation des Systems über einen der drei Aktivierungswege. (2) Alle drei Wege münden in die Bildung und Amplifikation des Enzyms C3-Konvertase (orange dargestellt). Dieses spaltet das Komplementprotein C3 in C3a (Anaphylatoxin) und C3b (Opsonin). (3) Die Freisetzung von C3b führt durch Anlagerung an die C3-Konvertase zum Aufbau der C5-Konvertase (orange dargestellt), welche die Spaltung von C5 in C5a (Anaphylatoxin) und C5b katalysiert. (4) Durch die Freisetzung von C5b wird letztlich der Terminale Weg eingeleitet. Gemeinsam mit den Komplementmolekülen C6, C7, C8 und C9 bildet C5b den Terminalen Komplement Komplex (TCC), der zur Lyse von Pathogenen führt. Die drei wesentlichen Effektorfunktionen (rot dargestellt) der Komplementaktivierung sind das Auslösen von Entzündungsreaktionen (Inflammation) über die Anaphylatoxine C3a und C5a, die Opsonisierung von Zielzellen durch C3b und die direkte Zellyse über den TCC. Eigene Darstellung adaptiert nach (13).

1.2.2 Initiation der Kaskade

Die Komplementkaskade kann grundsätzlich entweder über den Alternativen Weg, den Klassischen Weg oder den Lektin Weg initiiert werden (33). Die einzelnen Initiationsmechanismen werden im Folgenden näher erläutert.

Der Alternative Weg unterliegt einer kontinuierlichen Aktivität (*tickover*), die durch die spontane Hydrolyse des zentralen Komplementproteins C3 zu C3(H₂O) erreicht wird.

Die Reaktion führt zu einer Konformationsänderung des Moleküls und bedingt die Exposition neuer Bindungsstellen. Aufgrund dessen kann sich das Komplementprotein Faktor B an das gebildete Produkt $C3(H_2O)$ anlagern, welches im folgenden Schritt durch die Serinprotease Faktor D in seine Fragmente Ba und Bb gespalten wird. Während Ba freigesetzt wird, bleibt Bb gebunden. Die so gebildete lösliche C3-Konvertase $C3(H_2O)Bb$ katalysiert anschließend die Spaltung von C3 in das inflammatorisch wirkende Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b. Freigesetztes C3b bindet schließlich durch einen hochreaktiven Thioesterrest an umliegende Zelloberflächen. Dort kann sich erneut Faktor B anlagern und von der Serinprotease Faktor D gespalten werden. Diese Reaktion führt letztlich zur Bildung der oberflächengebundenen C3-Konvertase des Alternativen Wegs C3bBb (13, 22, 34).

Die Initiation des Klassischen und des Lektin Wegs ist im Gegensatz zum Alternativen Weg von spezifischen Aktivatoren abhängig. Beim Klassischen Weg sind diese Aktivatoren Immunkomplexe, welche sich durch die Interaktion von Antikörpern (IgM oder IgG) und Antigenen ausbilden. Der inaktive Komplementkomplex C1, bestehend aus C1q und jeweils zwei inaktiven Molekülen C1r und C1s, bindet über C1q an die Fc-Region der Antikörper in den Immunkomplexen. Diese Interaktion führt zur Aktivierung der Serinproteasen C1r und C1s, woraufhin die aktivierte Protease C1s die Spaltung der Proteine C2 und C4 in C2a bzw. C4a und C2b bzw. C4b katalysiert. Aus dieser Reaktion geht letztlich die C3-Konvertase des Klassischen Wegs $C4bC2b$ hervor (13, 22, 35). Es sei jedoch erwähnt, dass der Klassische Weg auch antigenunabhängig durch gramnegative Bakterien sowie Viren initiiert werden kann (36-38). Außerdem wurde berichtet, dass C1q auch direkt an veränderte körpereigene Zellen binden kann und den Klassischen Weg so einleitet (39, 40).

Der Lektin Weg ist dem Klassischen Weg ähnlich; er wird jedoch über Kohlehydratstrukturen auf mikrobiellen Oberflächen aktiviert. Diese Strukturen sind auf körpereigenen Zellen nicht vorhanden und werden durch Mannose-bindendes Lektin (MBL), Collectin-11 oder Ficoline erkannt. Die Interaktion führt zur Komplexbildung mit MBL-assoziierten Serinproteasen (MASPs) und bewirkt so die enzymatische Spaltung von C2 und C4 durch MASP-2. Wie beim Klassischen Weg führt dies zur Generierung der C3-Konvertase $C4bC2b$ (13, 41, 42).

Es muss jedoch erwähnt werden, dass durch die heutige Datenlage nicht mehr von einer strikten Trennung der drei Aktivierungswege ausgegangen werden kann. So könnten zum Beispiel Antikörper ebenfalls zur Aktivierung des Lektin Wegs führen oder Proteasen der MASP-Familie in die Aktivierung des Alternativen Wegs involviert sein (41, 43-46). Außerdem gibt es Hinweise, dass auch extrinsische Proteasen, vor allem

Proteasen aus der Koagulationskaskade, die Komplementproteine C3 und C5 aktivieren können (41).

1.2.3 C3-Konvertase

Je nach Aktivierungsweg wird entweder die C3-Konvertase C3bBb (Alternativer Weg) oder C4bC2b (Klassischer Weg und Lektin Weg) gebildet. Unabhängig des Aktivierungswegs katalysiert eine oberflächengebundene C3-Konvertase die Spaltung des Komplementproteins C3 in die Aktivierungsfragmente C3a und C3b. C3a ist ein Anaphylatoxin und wirkt proinflammatorisch über den spezifischen G-gekoppelten Rezeptor C3aR. Auf diesem Weg bewirkt C3a beispielsweise die Rekrutierung von Leukozyten, die Histamin-Freisetzung aus Mastzellen oder führt zur Vasodilatation. Weiterhin wirkt es modulierend auf die adaptive Immunantwort, erhöht die Kontraktion der glatten Muskulatur und vermittelt selbst eine antimikrobielle Wirkung (13, 24, 47-49). Das Opsonin C3b bindet hingegen über eine Thioesterbindung kovalent an Pathogenoberflächen oder verändertes körpereigenes Material und markiert dieses so für die darauffolgende Phagozytose. Oberflächengebundenes C3b dient darüber hinaus als Ausgangspunkt für die Formation neuer C3-Konvertasen und führt so zur Amplifikation der Kaskade (*amplification loop*). Vor allem aufgrund dieser selbst-amplifizierenden Wirkung ist die Regulation des Komplementsystems essentiell (13).

1.2.4 C5-Konvertase

Im weiteren Verlauf der Komplementkaskade kommt es durch Anlagerung von C3b an bestehende C3-Konvertasen zur Bildung von C5-Konvertasen. Je nach Aktivierungsweg entsteht dabei entweder die C5-Konvertase des Alternativen Wegs C3bBbC3b oder die des Klassischen bzw. des Lektin Wegs C4bC2bC3b. Beide Formen katalysieren die Spaltung des Komplementproteins C5 in C5a und C5b (13). C5a ist ebenfalls ein Anaphylatoxin und induziert proinflammatorische Reaktionen über den spezifischen G-gekoppelten Rezeptor C5aR. Es vermittelt dabei ähnliche Effektorfunktionen wie C3a. Die Freisetzung von C5b leitet den Terminalen Weg ein (22, 49).

1.2.5 Terminaler Weg

Das aus der C5-Spaltung resultierende Fragment C5b dient als Ausgangspunkt für die Bildung des Terminalen Komplement Komplex (TCC). C5b bildet zunächst zusammen mit dem Komplementprotein C6 einen Komplex (C5bC6), welcher sich an

Zieloberflächen anlagert und anschließend von C7 gebunden werden kann. Der so entstandene Komplex C5b-7 lagert sich nun in den Lipidbilayer der Zielmembran ein. Die Bindung von C8 an C5b-7 führt anschließend zunächst zur Bildung einer instabilen Pore. Die Stabilisierung und vollständige Ausbildung des TCCs (C5b-9) erfolgt schließlich durch Anlagerung und Polymerisation von bis zu 13 C9 Molekülen. Durch die fehlende Membranintegrität kommt es danach zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zielzelle und zum Verlust der mitochondrialen Polarität sowie der zellulären ADP/ATP-Reserven. Dies bedingt letztlich die Lyse der Zelle (49-51).

1.3 Regulation des Komplementsystems

Das Komplementsystem schützt den Organismus als zentraler Teil der angeborenen Immunantwort schnell und effektiv vor eingedrungenen Pathogenen, ist an der Beseitigung von modifiziertem endogenen Zellmaterial beteiligt und für die Aufrechterhaltung der wirtseigenen Immunhomöostase essentiell. Da es sich jedoch um ein selbstamplifizierendes System handelt, bedarf es gleichzeitig einer strikten Regulation, sodass intakte körpereigene Strukturen zuverlässig vor komplementvermittelter Schädigung geschützt werden, während Pathogene und modifiziertes Zellmaterial effektiv eliminiert werden. Zu diesem Zweck exprimiert der humane Organismus eine Vielzahl an komplementregulierenden Proteinen, die auf allen Ebenen der Kaskade wirken und entweder in der Flüssigphase vorliegen oder membrangebunden auf körpereigenen Zellen lokalisiert sind. Eine Fehlregulation des Komplementsystems hat enorme Auswirkungen auf die Immunhomöostase und kann zu immunpathologischen Veränderungen wie beispielsweise der Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen (13, 52, 53).

In den folgenden Kapiteln werden insbesondere die zur Faktor H/FHR Proteinfamilie gehörigen Komplementregulatoren ausführlich beschrieben. Es sei jedoch erwähnt, dass eine Vielzahl weiterer komplementregulatorischer Proteine existiert (13).

1.3.1 Faktor H/FHR Proteinfamilie

Zur Faktor H/FHR Familie gehören der Komplementinhibitor Faktor H, dessen verkürzte Spleißvariante Factor H-like Protein 1 (FHL-1) und die fünf Faktor H verwandten Proteine 1-5 (FHRs). Alle zugehörigen Proteine sind aus einer unterschiedlichen Anzahl globulärer Untereinheiten aufgebaut, welche als *short consensus repeats* (SCRs) bezeichnet werden (54, 55). Ein SCR besteht dabei aus etwa 60 Aminosäuren, die in fünf β -Faltblättern angeordnet sind (56). Da die *CFHR* Gene durch Tandemduplikationen aus

dem *Faktor H* Gen entstanden sind, weisen die SCRs der FHR Proteine eine unterschiedlich hohe Sequenzhomologie zu den SCRs von Faktor H auf (57) (Abbildung 2).

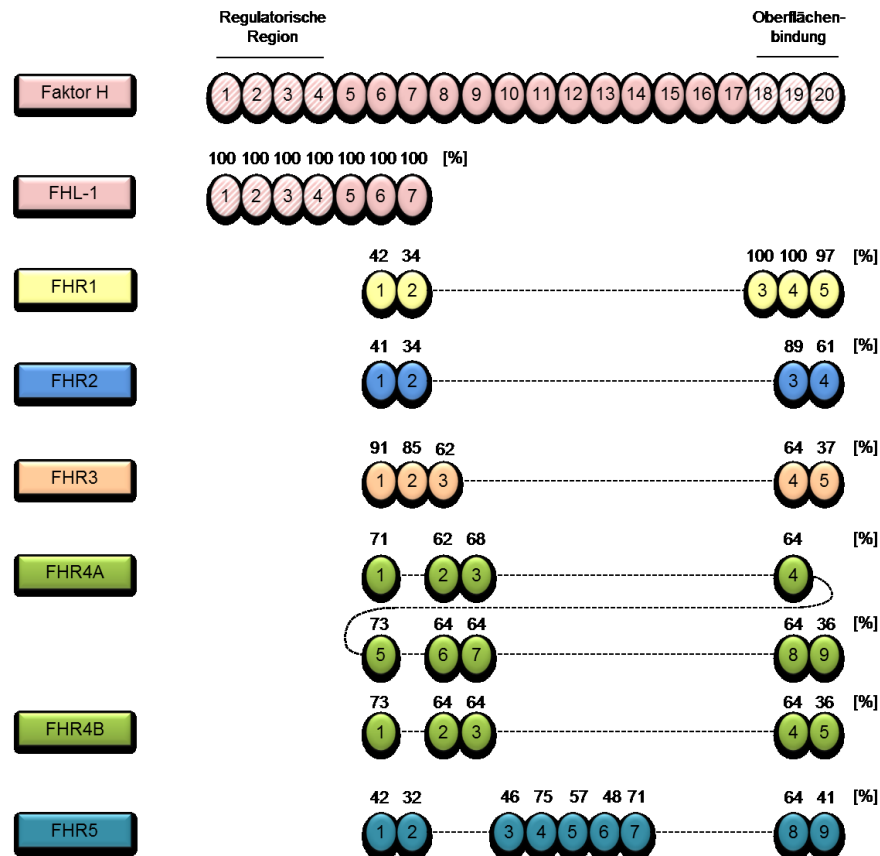


Abbildung 2: Faktor H/FHR Proteinfamilie. Alle Proteine der Faktor H/FHR Familie sind aus strukturellen Untereinheiten (*short consensus repeats*, SCRs) aufgebaut. Faktor H besteht aus 20 SCRs, wobei die regulatorische Region innerhalb der N-terminalen SCRs 1-4 lokalisiert ist. Die Zellbindung wird dagegen von den C-terminalen SCRs 18-20 vermittelt. Die jeweiligen SCRs der FHR Proteine zeigen eine unterschiedlich hohe Sequenzhomologie zu den SCRs von Faktor H. Die prozentuale Übereinstimmung ist oberhalb der betreffenden SCRs als Zahlenwert angegeben. FHL-1 ist eine Spleißvariante von Faktor H und weist demnach vollständige Sequenzhomologie auf. Die Glykosylierungen sind aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet. Eigene Darstellung adaptiert nach (54).

Die kodierenden Gene sind innerhalb des 415 kbp langen *regulation of complement activation* (RCA) Genclusters auf Chromosom 1q32 lokalisiert (Abbildung 3). Die *CFHR* Gene liegen dabei *downstream* des *Faktor H* Gens und ordnen sich wie folgt an: *CFHR3*, *CFHR1*, *CFHR4*, *CFHR2*, *CFHR5* (54, 58). Erwähnenswert ist, dass die Gene für die Faktor H verwandten Proteine in der modernen Schreibweise mit *CFHR* abgekürzt werden; auf Proteinebene spricht man hingegen von FHRs. FHL-1 wird vom *Faktor H* Gen kodiert und durch alternatives Spleißen generiert (59).

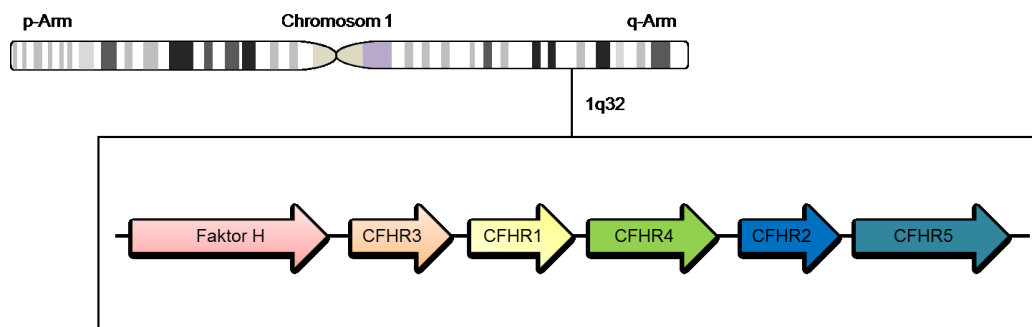


Abbildung 3: Faktor H/CFHR Genfamilie. Alle kodierenden Gene befinden sich auf Chromosom 1q32 innerhalb des RCA Gencusters und sind, wie in der Grafik abgebildet, angeordnet. FHL-1 wird vom *Faktor H* Gen kodiert und entsteht durch alternatives Spleißen. Eigene Darstellung adaptiert nach (54).

1.3.2 Faktor H – Inhibitor des Alternativen Wegs

Das lösliche Glykoprotein Faktor H (150 kDa) ist der Hauptregulator des Alternativen Wegs und wirkt inhibierend auf das Komplementsystem. Faktor H ist aus 20 SCRs aufgebaut. Dabei beinhalten die N-terminalen SCRs 1-4 die Regulationsdomäne, während die C-terminalen SCRs 18-20 die Bindung an Oberflächen vermitteln (57, 58, 60-62). Die negative Regulation des Alternativen Wegs erfolgt in der Flüssigphase über drei wesentliche Funktionen. So konkurriert Faktor H mit Faktor B um die Bindung an C3b (1), wodurch die Bildung von C3- und C5-Konvertasen gehemmt wird. Weiterhin beschleunigt Faktor H den Zerfall von bereits gebildeten Konvertasen (2) und assistiert als Kofaktor für Faktor I (3) bei der Degradation von C3b zu dessen inaktiver Form iC3b (63-65). Um körpereigenes Gewebe vor komplementvermittelten Schäden zu schützen, bindet Faktor H über Glykosaminoglykane und Heparanstrukturen an intakte Oberflächen und inhibiert die Komplementaktivität dort lokal (66). Weiterhin bindet Faktor H über oxidationspezifische Epitope, insbesondere Malondialdehyd (MDA) und Malondialdehyd-Acetaldehyd (MAA -Epitope, an modifiziertes körpereigenes Material und assistiert dort bei der Faktor I-vermittelten C3b-Inaktivierung. Durch die daraus resultierende Komplementinhibition wird die proinflammatorische Wirkung des veränderten Wirtsmaterials reduziert. Die Interaktionsdomänen für MDA/MAA-Epitope sind innerhalb der Oberflächenbinderegion (SCRs 19-20) sowie in SCR 7 lokalisiert (67).

Interessanterweise haben sich viele humanpathogene Erreger, wie zum Beispiel *Candida albicans* (Hefepilz), *Staphylokokkus aureus* (grampositives Bakterium) oder *Neisseria meningitidis* (gramnegatives Bakterium) die schützende Funktion von Faktor H zunutze gemacht, um der Erkennung und Eliminierung durch das wirtseigene Immunsystem zu entgehen (Immunevasion). Dabei binden sie den Komplementinhibitor mit

Hilfe von Immunevasionsproteinen an ihre Oberfläche. So wird die protektive Wirkung, die Faktor H auf körpereigenen Strukturen vermittelt, auf Pathogene übertragen (68-70).

1.3.3 Faktor H verwandte Proteine (FHRs)

Die fünf FHR Proteine sind ebenfalls lösliche Glykoproteine und bestehen aus vier (FHR2), fünf (FHR1, FHR3 und FHR4B) bzw. neun SCRs (FHR4A und FHR5) (54). FHR4 zirkuliert in zwei unterschiedlichen Formen (FHR4A und FHR4B), wobei es sich bei FHR4B um eine kürzere Isoform des Proteins handelt. Erstaunlicherweise besitzt keines der FHR Proteine SCRs, die homolog zur regulatorischen Region (SCRs 1-4) von Faktor H sind (71). Diese Tatsache unterstreicht die individuelle Funktion der Faktor H verwandten Proteine gegenüber Faktor H.

FHR1, FHR2 und FHR5 lassen sich aus strukturellen Gründen einer Gruppe zuordnen, da sie durch eine ein konserviertes Dimerisierungsmotiv innerhalb der N-terminalen SCRs 1-2 in der Lage sind, Homo- und Heterodimere auszubilden (Abbildung 4). Die Dimerbildung erfolgt dabei *head-to-tail*. FHR3 und FHR4 besitzen dieses Motiv nicht und zirkulieren daher ausschließlich in monomerer Form (54, 72).

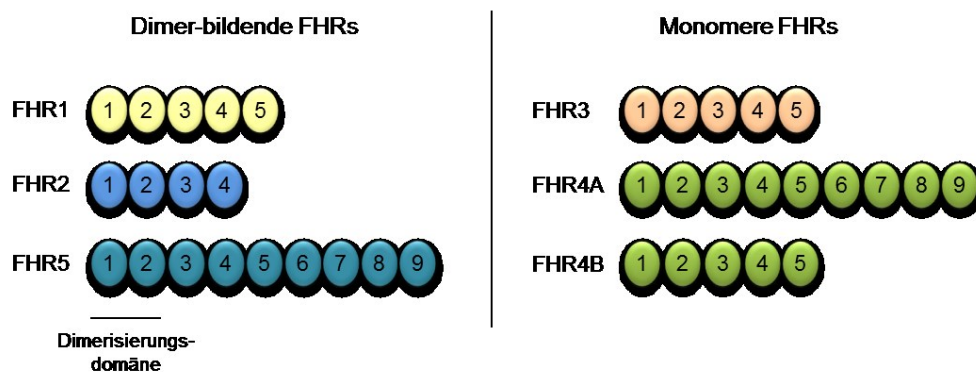


Abbildung 4: FHR Proteine. Die fünf FHRs bestehen aus vier, fünf und neun SCRs. Durch ein konserviertes Dimerisierungsmotiv innerhalb der SCRs 1-2 können FHR1, FHR2 und FHR5 Homo- und Heterodimere ausbilden. FHR3 und FHR4 besitzen dieses N-terminale Dimerisierungsmotiv nicht und liegen daher als Monomere vor. Die Glykosylierungen sind aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet.

Funktionell unterscheiden sich die einzelnen FHRs stark voneinander. Die bisher bekannten Wirkmechanismen reichen von inhibitorischen und aktivierenden Effekten auf das Komplementsystems bis hin zur Modulation des adaptiven Immunsystems. So inhibiert FHR1 die C5-Konvertase und bedingt dadurch die Blockierung des Terminalen Wegs (73). FHR2 inhibiert die C3-Konvertase des Alternativen Wegs und verhindert

ebenfalls die Ausbildung des TCCs (74). Für FHR3 wurde in älteren Studien ein fördernder Einfluss auf die Faktor H/ Faktor I-vermittelte C3b-Inaktivierung nachgewiesen (75). Neuesten Erkenntnissen zufolge ist FHR3 darüber hinaus in die Regulation humaner B-Zellen involviert. FHR3 inhibiert durch Bindung an C3d die Interaktion zwischen dem C3-Aktivierungsfragment und CR2 und blockiert auf diese Weise die Ko-Aktivierung von B-Zellen (76).

Im Gegensatz zu den inhibitorisch wirkenden FHR Proteinen FHR1, FHR2 und FHR3 fungieren FHR4 und FHR5 als Komplementaktivatoren (71, 77). Es existieren allerdings auch konträre Daten, die zeigen, dass FHR1 eine komplementaktivierende Wirkung vermitteln könnte (78). Dies verdeutlicht, dass die genaue Funktionsweise der FHR Proteine noch nicht vollständig verstanden ist. Aufgrund dessen ist die funktionelle Charakterisierung der FHRs ein zentrales Thema der Komplementforschung.

1.3.4 FHR5

FHR5 wird, wie die meisten Komplementproteine, vorwiegend in der Leber produziert und zirkuliert mit einer Konzentration von 3-6 µg/ml in humanem Serum. Außerdem liegt ein Teil von FHR5 mit Lipoproteinen assoziiert vor. FHR5 besitzt ein Molekulargewicht von 65 kDa und ist aus insgesamt neun SCRs aufgebaut, wobei sich zwei Glykosylierungspositionen innerhalb von SCR 2 und SCR 7 befinden (79, 80). Unter allen FHR Proteinen ist FHR5 einzigartig, da es mit den SCRs 3-7 über sequenzhomologe Bereiche zur Mittelregion von Faktor H (SCRs 10-14) verfügt (58). Ob dies eine funktionelle Konsequenz nach sich zieht, ist jedoch bisher nicht beschrieben.

Wie bereits erwähnt, gehört FHR5 durch das N-terminal lokalisierte Dimerisierungsmotiv (SCRs 1-2) zu den Dimer-bildenden FHR Proteinen (72). So zirkuliert FHR5 vor allem als Homodimer im Serum. Die Bildung von Heterodimeren mit FHR1 und FHR2 wurde ebenfalls in Betracht gezogen, jedoch ist aktuell nicht abschließend geklärt, ob FHR5 *in vivo* tatsächlich als Heterodimer mit anderen FHR Proteinen vorliegt (72, 81). Da die Bildung von Heterodimeren funktionelle Auswirkungen haben kann, sind strukturelle Untersuchungen aktuell Gegenstand intensiver Forschung.

Die physiologische Funktion von FHR5 ist bis dato nicht vollständig verstanden. Bisher ist bekannt, dass FHR5 über die SCRs 5-7 an modifizierte endogene Oberflächen bindet und dort als Ankerpunkt für den Komplementaktivator Properdin dient (77, 82, 83). Properdin ist ein positiver Regulator des Alternativen Komplementwegs und damit essentiell für die Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts. Properdin zirkuliert mit einer Serumkonzentration von 5-25 µg/ml und liegt unter physiologischen Bedingungen

Da FHR5 vorwiegend oberflächengebunden agiert, ist die Untersuchung mit spezifischen Oberflächenmolekülen funktionell relevant. So zeigen Vorarbeiten, dass FHR5 mit der Mittelregion (SCRs 5-7) an oxidationsspezifische MAA-Epitope bindet (82). Ferner interagiert FHR5 mit der extrazellulären Matrix (EZM), allerdings konnte bisher nicht nachgewiesen werden, an welche EZM-Bestandteile FHR5 genau bindet und welche SCRs von FHR5 diese Interaktion vermitteln (88). Als weitere endogene Interaktionspartner von FHR5 wurden die Pentraxine Pentraxin 3 (PTX3) und C-reaktives Protein (CRP) identifiziert, die unter anderem als Opsonine fungieren (79, 88, 89).

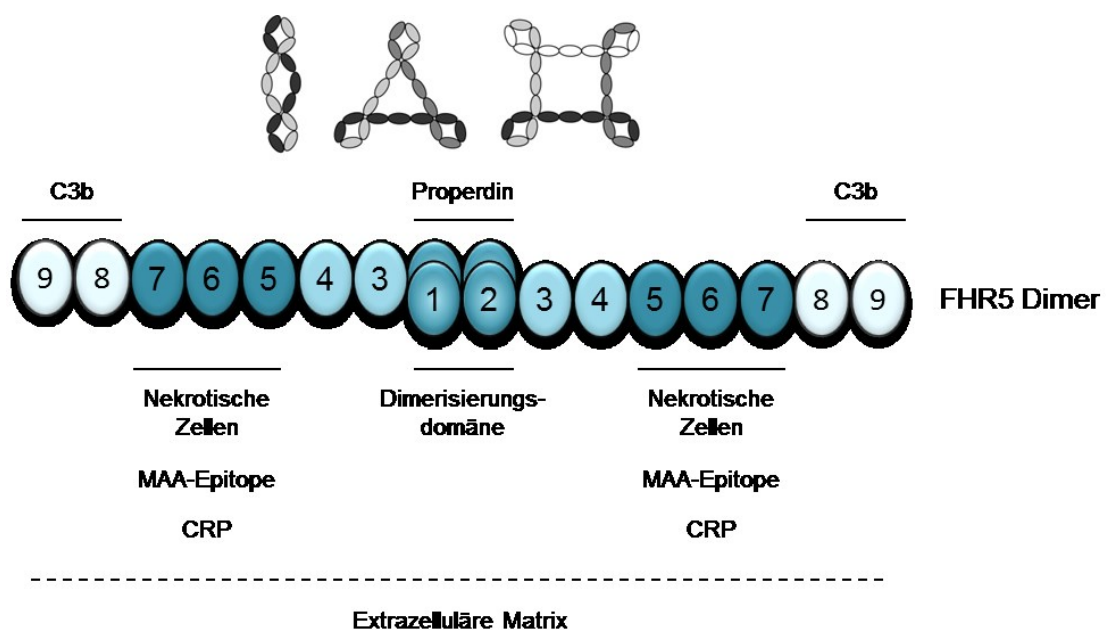


Abbildung 5: Struktur und Interaktionsdomänen von FHR5. FHR5 dimerisiert über die N-terminalen SCRs 1-2 zu Homodimeren. Die Oberflächenbindung wird von den SCRs 5-7 vermittelt. In dieser Region sind auch die Bindedomänen für MAA-Epitope und C-reaktives Protein (CRP) lokalisiert. Oberflächengebundenes FHR5 rekrutiert den Komplementaktivator Properdin (zirkuliert als Dimer, Trimer und Tetramer; grau dargestellt) über die N-terminalen SCRs 1-2 und C3b

über die C-terminalen SCRs 8-9. Die extrazelluläre Matrix wurde als Ligand von FHR5 identifiziert, jedoch sind die Interaktionsdomänen bisher nicht charakterisiert. Die Glykosylierungen sind aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet. Die Größenverhältnisse von FHR5 und Properdin sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

FHR5 wurde ursprünglich in glomerulären Ablagerungen bei Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen entdeckt, wo es mit C3b und C5b-9 kolokalisierte (90, 91). Dass FHR5 an der Pathogenese komplementvermittelter Nierenkrankheiten beteiligt sein muss, wurde daher schon früh vermutet. Tatsächlich konnten Mutationen im CHFR5-Gen mit der komplementassoziierten Nierenerkrankung C3-Glomerulopathie (C3G) in Zusammenhang gebracht werden (80, 92-94). Diese werden im Verlauf dieser Arbeit näher beschrieben. Wie genau FHR5 in die Pathogenese von C3G involviert ist, ist jedoch trotz intensiver Forschung nicht verstanden.

1.4 Komplement und oxidationsspezifische Epitope

Verschiedene Studien zeigen, dass das Komplementsystem in Verbindung mit der Exposition sogenannter oxidationsspezifischer Epitope (OSEs) steht (67, 95). OSEs bezeichnen strukturelle Neoepitope auf endogenem Material, die im Rahmen der oxidativen Schädigung von Lipiden, insbesondere Phospholipiden, generiert werden (Lipidperoxidation) (96). Oxidationsreaktionen sind Teil physiologischer Vorgänge und notwendig für den zellulären Metabolismus sowie für die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase. Pathophysiologische Umstände, zum Beispiel Inflamationsprozesse, begünstigen die Lipidperoxidation jedoch und führen damit zur Akkumulation oxidationsspezifischer Epitope (97).

OSEs gehören zur Gruppe der DAMPs und umfassen eine Reihe unterschiedlicher Strukturen wie beispielsweise Malondialdehyd-modifizierte Aminogruppen. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe sind Malondialdehyd-Acetaldehyd-Epitope (MAA-Epitope), die auf verändertem körpereigenem Material, Mikrovesikeln oder oxidierten Lipoproteinen zu finden sind. MAA-Epitope repräsentieren stabile MDA-Lysin-Addukte (Hybrid-Addukte), die aus der Reaktion von Malondialdehyd mit Acetaldehyd und primären Aminen hervorgehen und eine potente Immunantwort auslösen können (97-101) (Abbildung 6).

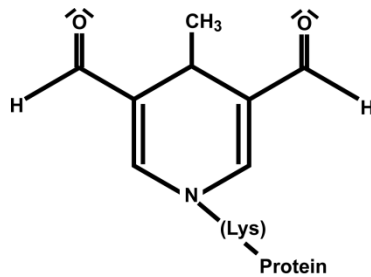


Abbildung 6: Strukturformel eines MAA-Addukts. Oxidationsspezifische MAA-Addukte entstehen in Folge von Lipidperoxidation durch die Reaktion von Malondialdehyd mit Acetaldehyd und primären Aminen. Die Addukte sind stabil und können eine potente Immunreaktion auslösen. MAA-Epitope finden sich zum Beispiel auf modifiziertem Wirtsmaterial, Mikrovesikeln und oxidierten Lipoproteinen. Eigene Darstellung adaptiert nach (95) und (101).

MAA-Epitope, die auf modifizierten Oberflächen exponiert werden, können vom Komplementinhibitor Faktor H gebunden werden. Dort verankert, assistiert Faktor H bei der Faktor I vermittelten Degradation von C3b zu iC3b und trägt so zur lokalen Inhibition des Komplementsystems bei. Darüber hinaus reduziert Faktor H die OSE-induzierte IL-8 Sekretion in verschiedenen Zelltypen. Durch diese Mechanismen wird die proinflammatorische Wirkung von modifiziertem Zellmaterial reduziert und der Organismus vor einer überschießenden Reaktion des Immunsystems geschützt. Liegt jedoch eine Mutation im *Faktor H* Gen (Austausch der Aminosäure 402 Y→H) vor, ist die Bindung des Regulatorproteins (Faktor H_{H402}) an MAA-Epitope reduziert. Aufgrund der verminderten Komplementinhibition wird der proinflammatorische Effekt des MAA-exponierenden Materials nicht mehr ausreichend limitiert. Die Expression der mutierten Variante Faktor H_{H402} gilt daher als Risikofaktor für die Netzhauterkrankung Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (67).

Wie bereits erwähnt, wurde FHR5 in Vorarbeiten als weiteres MAA-bindendes Komplementprotein identifiziert (82). Darüber hinaus wurde auch die Bindung des Anaphylatoxins C3a an MDA-Epitope nachgewiesen (95).

1.5 Die Niere – Zielorgan komplementvermittelter Erkrankungen

1.5.1 Komplementassoziierte Nierenerkrankungen

Komplementdefekte sind mit einer Reihe verschiedener Nierenerkrankungen assoziiert. So wurde nachgewiesen, dass Fehlfunktionen des Systems in die Pathogenese der Erkrankungen C3-Glomerulopathie, Atypisch-Hämolytisch-Urämisches Syndrom, IgA-Nephropathie und Lupus Nephritis involviert sind (80, 102-105). Auch bei Membranöser Nephropathie ist von einer Beteiligung des Komplementsystems auszugehen (90, 106).

Da die Niere neben dem Auge (107-109) das Hauptzielorgan komplementvermittelter Krankheiten repräsentiert, wird im Folgenden ein kurzer Überblick über die Anatomie des Organs gegeben.

1.5.2 Anatomie der Niere

Die menschlichen Nieren sind paarig angelegt und in Höhe der elften und zwölften Rippe links und rechts der Wirbelsäule lokalisiert. Bei Erwachsenen sind die Organe ca. 12 cm lang, 6 cm breit und wiegen gemeinsam ungefähr 300 g (110-112). Hauptaufgaben sind die Entgiftung des Organismus und die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts. Zu diesem Zweck fließen pro Tag etwa 1700 l Blut durch die Nieren, wobei die Bildung von fast 170 l Primärharn erfolgt. Dieser wird schließlich zu ca. 1,5 l Urin (Sekundärharn) konzentriert (113). Die innere Struktur einer Niere gliedert sich in die außen liegende Nierenrinde (*cortex renis*) und das innen liegende Nierenmark (*medulla renis*). Jede Niere besteht aus etwa einer Million funktionellen Einheiten, den sogenannten Nephronen, in denen die Harnbildung stattfindet. Ein Nephron setzt sich wiederum aus einem Nierenkörperchen mit anschließendem Tubulussystem zusammen. Beim Nierenkörperchen handelt es sich um ein Kapillarknäuel (Glomerulus), das von einer Epithelkapsel (Bowman-Kapsel) umhüllt ist (112). Zum besseren Verständnis wird der Aufbau eines Glomerulus bzw. Nierenkörperchens im Folgenden kurz erläutert.

1.5.3 Der Glomerulus

Ein Glomerulus ist Teil eines Nephrons und Ort der renalen Filtration (114). An seiner typischen Struktur sind verschiedene Zelltypen beteiligt: Parietale Epithelzellen, Mesangialzellen, Podozyten und glomeruläre Endothelzellen (Abbildung 7) (115).

Parietale Epithelzellen bilden die sogenannte Bowman-Kapsel, die den Glomerulus dicht umschließt und auf diese Weise die anatomische Einheit des Nierenkörperchens bildet (112, 115). Intraglomeruläre Mesangialzellen organisieren sich gemeinsam mit einer spezifischen extrazellulären Matrix (*mesangial matrix*) zum stilkförmigen Mesangium. Sie besitzen kontraktile Eigenschaften sowie Phagozytose-Aktivität und tragen so unter anderem zur Regulation der glomerulären Filtrationsrate und zur Entfernung von Ablagerungen bei. Sie sind für die Struktur und Funktion des Glomerulus essentiell und interagieren sowohl mit Endothelzellen als auch mit Podozyten (112, 115-118). Das fenestrierte Endothel (Kapillarseite) und Podozyten (Harnseite) formen, gemeinsam mit der dazwischenliegenden glomerulären Basalmembran (GBM), die dreischichtige

glomeruläre Filtrationsbarriere; eine Art hocheffizientes Sieb, das selektiv Abfallprodukte des Stoffwechsels aus dem Blut filtriert und dabei den Primärharn produziert (115, 119, 120).

Bei der GBM handelt es sich um eine spezifische extrazelluläre Matrix bestehend aus Laminin, Kollagen Typ IV, Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykan (insbesondere Aggrin). Sie wird sowohl von Endothelzellen als auch Podozyten synthetisiert (121). Laminine werden dabei als Heterotrimere mit drei unterschiedlichen Ketten (α , β und γ) sekretiert. Da verschiedene Formen der jeweiligen Ketten existieren, können mindestens 15 verschiedene Heterotrimere gebildet werden. Die Nomenklatur der Isoformen basiert auf der Zusammensetzung der jeweiligen Ketten ($\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$ = Laminin-521). Ein Laminin-Heterotrimer besitzt eine kreuzförmige Struktur bei dem die *coiled-coil* Domänen der einzelnen Ketten umeinander gewickelt sind (Abbildung 7) (121-123). Die unten anschließende globuläre Domäne enthält die Bindungsstelle für Oberflächenrezeptoren (124). Die drei freien Arme (N-terminale Domänen) der jeweiligen Ketten vermitteln die Interaktion von einzelnen Trimeren und erlauben damit die Bildung von Laminin-Polymeren. Die Polymerbildung initiiert die Bildung der Basalmembran. Die GBM unterliegt während ihrer Bildung und Reifung Veränderungen, die auch den Austausch von Laminin-Isoformen mit sich bringen. Die reife GBM besteht vorwiegend aus Laminin-521 (121).

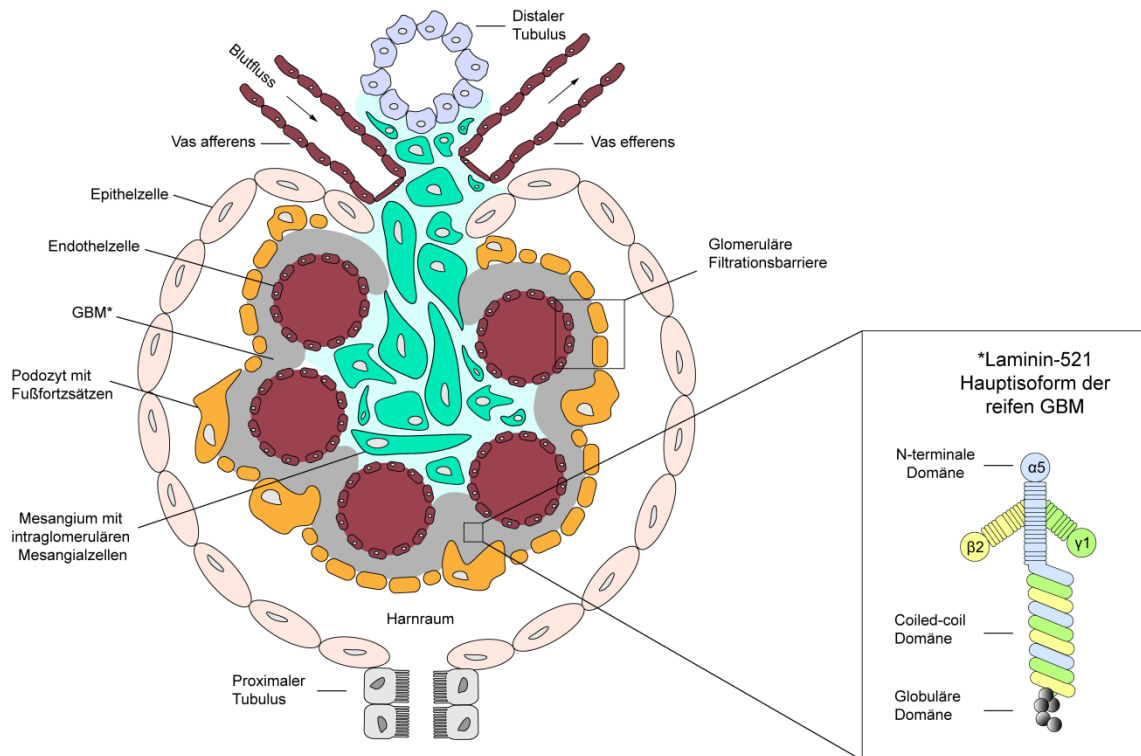


Abbildung 7: Aufbau eines Glomerulus. Der Glomerulus (Kapillarknäuel) ist in die sogenannte Bowman-Kapsel eingehüllt, welche aus parietalen Epithelzellen aufgebaut ist. Im Inneren befindet sich das, aus intraglomerulären Mesangialzellen und extrazellulärer Matrix bestehende, Mesangium. Die glomeruläre Filtrationsbarriere wird aus dem fenestrierten Endothel, Podozyten und der dazwischenliegenden glomerulären Basalmembran (GBM) gebildet. Die GBM ist eine hochspezialisierte extrazelluläre Matrix aus Laminin, Kollagen Typ IV, Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykan. Die GBM verändert sich während ihrer Reifung und enthält dabei verschiedene Lamininisoformen. Die Hauptisoform der reifen GBM ist Laminin-521. Die Struktur von Laminin-521 ist rechts schematisch dargestellt. An den Glomerulus schließt sich das Tubulussystem an. Eigene Darstellung adaptiert nach (115) und (123).

1.6 C3-Glomerulopathie

Die komplementassoziierte Nierenerkrankung C3-Glomerulopathie (C3G) ist nach aktuellem Konsens eine Subform der membranproliferativen Glomerulonephritis (MPGN). Mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro einer Million handelt es sich bei C3G um eine sehr seltene Erkrankung für die eine geeignete Therapie bisher fehlt (125-127). Die Tatsache, dass 50 % der C3G Patienten innerhalb eines Jahrzehnts terminale Niereninsuffizienz (*end stage renal disease*) entwickeln und 45-60 % nach einer Transplantation ein Rezidiv erleiden, verdeutlicht zudem die schlechte Prognose der Erkrankung (127).

MPGN selbst ist eine komplexe und multifaktorielle Erkrankung mit heterogenem Erscheinungsbild. Die moderne Klassifizierung bedient sich vor allem der Unterscheidung zwischen immunkomplexvermittelten und nicht-immunkomplexvermittelten Formen, während die ursprüngliche Einteilung in MPGN I, II und III ausschließlich auf lichtmikroskopisch sichtbaren histologischen Merkmalen sowie der Lokalisation und

Elektronendichte der Ablagerungen beruhte. Immunfluoreszenzfärbungen ermöglichen jedoch heutzutage eine detailliertere Unterscheidung, da mit dieser Methode sowohl C3- als auch Immunkomplexablagerungen (IgG- und/oder IgM- bzw. C1) nachgewiesen werden können (126). Wird eine isolierte bzw. dominante C3-Ablagerung ohne Immunkomplexe nachgewiesen, wird die Erkrankung als C3-Glomerulopathie bezeichnet. Diese umfasst die Untergruppen C3-Glomerulonephritis (C3GN) und *Dense Deposit Disease* (DDD). Die Einteilung in die Subformen basiert auf histologischen und elektronenmikroskopischen Charakteristika (Abbildung 8). Die Ablagerung des Komplementproteins C3 und dessen Aktivierungsfragmenten im Glomerulus verdeutlicht die Fehlregulation des Alternativen Komplementwegs bei C3G (126-128).

Interessanterweise geht der Erkrankung häufig eine (Streptokokken-) Infektion voraus. Die damit einhergehende Komplementaktivierung könnte somit möglicherweise als Krankheitsauslöser in Betracht gezogen werden (125, 128).

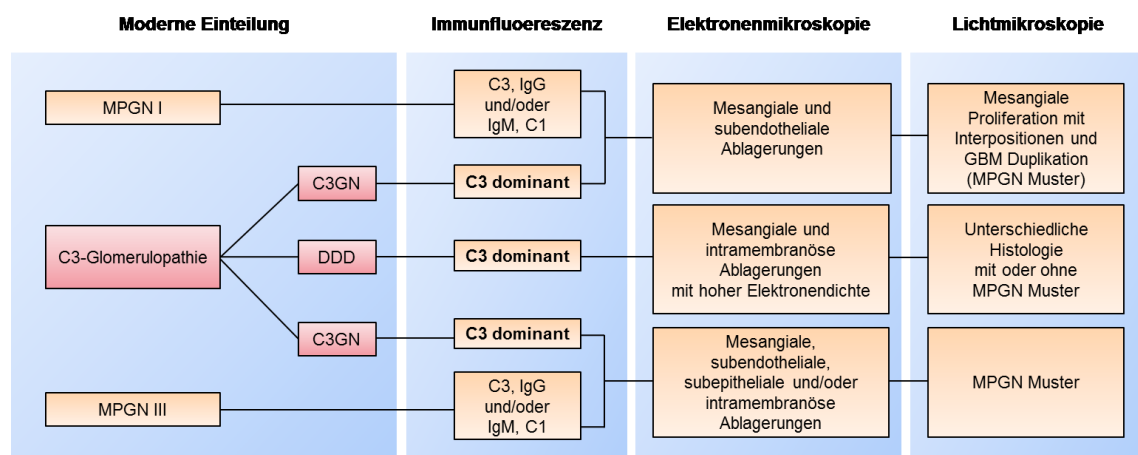


Abbildung 8: Moderne Klassifizierung von C3-Glomerulopathie. C3-Glomerulopathie ist eine Subform der Membranoproliferativen Glomerulonephritis (MPGN). Charakteristisch für die Erkrankung ist die dominante C3-Ablagerung im Glomerulus, welche durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden kann. Die Klassifizierung in die beiden Untergruppen C3-Glomerulonephritis (C3GN) und *Dense Deposit Disease* (DDD) erfolgt durch typische licht- und elektronenmikroskopisch sichtbare Muster. Eigene Darstellung adaptiert nach (126).

1.6.1 Genetische Veränderungen im *FH/CFHR* Gencluster als Ursache für C3-Glomerulopathie

Viele C3G Patienten weisen erworbene oder genetische Defekte bei der Regulation des Alternativen Komplementwegs auf (127, 129-131). Wie bereits unter Punkt 1.3.1 beschrieben, sind die Gene für die Faktor H/FHR Proteinfamilie innerhalb des RCA Genclusters lokalisiert, das aufgrund seiner Anordnung sensibel für Kopienzahlvariationen

(*copy number variations*) und genomische Umstrukturierungen (*genomic rearrangements*) wie Insertionen, Duplikationen oder Deletionen ist. Eine solche Umstrukturierung kann zur Expression abnormer Proteine führen, was letztlich mit einer fehlerhaften Komplementregulation assoziiert ist. Im Jahr 2014 wurde bei zwei verwandten C3G Patienten (#635 und #638) eine 25 kbp lange chromosomale Deletion nachgewiesen, die auf Proteinebene zur Expression eines, aus FHR2 und FHR5 bestehenden, Hybridproteins (FHR2₁₋₂-FHR5) führt (Abbildung 9). Durch die Fusion der N-terminalen SCRs 1-2 von FHR2 mit FHR5 kann das Hybridprotein große Multimere ausbilden, welche die C3-Konvertase stabilisieren und eine übermäßige Komplementaktivierung triggern (80).

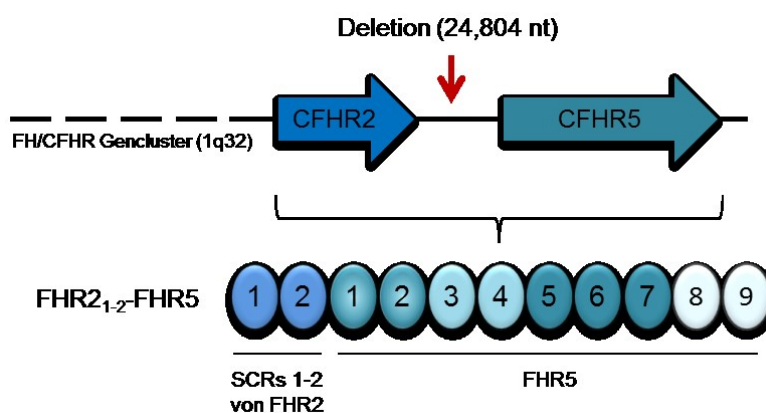


Abbildung 9: Hybridprotein aus FHR2 und FHR5 (FHR2₁₋₂-FHR5). Eine 24,804 nt lange chromosomale Deletion im RCA Gencluster führt bei zwei C3G Patienten zur Expression eines FHR2₁₋₂-FHR5 Hybridproteins. Dieses triggert eine überschießende Komplementaktivität und trägt so zur Pathogenese der Erkrankung bei. Die Glykosylierungen sind aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet. Eigene Darstellung adaptiert nach (80).

Anschließend wurde bei einer C3G Patientin das Pendant zum FHR2₁₋₂-FHR5 Hybridprotein gefunden. Bei diesem Protein sind die N-terminalen SCRs 1-2 von FHR5 mit FHR2 (FHR5₁₋₂-FHR2) fusioniert (92). Darüber hinaus konnte ein abnormes FHR5 Protein in einer zypriotischen Kohorte gefunden werden, dem eine interne Duplikation der für die SCRs 1 und 2 kodierenden Bereiche zu Grunde liegt. Dies führt auf Proteinebene zur Expression eines FHR5₁₋₂-FHR5 Hybridproteins (93). Die gleiche Mutation konnte jedoch mittlerweile auch in Patienten ohne zypriotische Herkunft gefunden werden (94). Allerdings beschränken sich die Mutationen nicht nur auf die *CFHR2* und *CFHR5* Gene. Es existieren ebenfalls Fälle, bei denen heterozygote Mutationen zur Expression eines abnormen FHR1 Proteins (FHR1₁₋₄-FHR1) oder Hybridproteinen aus FHR3 und FHR1 (FHR3₁₋₂-FHR1) sowie FHR1 und FHR5 führen (132-134).

2 Fragestellung

Ein korrekt reguliertes Komplementsystem ist für die Aufrechterhaltung der humanen Immunhomöostase essentiell. Disbalancen bei der Komplementregulation können demnach enorme Auswirkungen auf die Immunhomöostase haben und immunpathologische Veränderungen bewirken. Der menschliche Körper exprimiert daher eine Vielzahl an Proteinen, die das Komplementsystem auf unterschiedlichen Ebenen der Kaskade regulieren (13). Wichtige Regulatoren sind die Mitglieder der Faktor H/FHR Proteinfamilie. Während die Funktionen des Komplementinhibitors Faktor H und dessen Rolle bei verschiedenen Erkrankungen bereits gut charakterisiert sind, rückten in den letzten Jahren vor allem die fünf Faktor H verwandten Proteine (FHR1-FHR5) in den Fokus der Forschung (54). Seit geraumer Zeit ist daher bekannt, dass FHR5 in die Pathogenese der Nierenerkrankung C3-Glomerulopathie involviert ist, für die bisher keine spezifische Therapie etabliert werden konnte. Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Kopienzahlvariationen im *CFHR5* Gen identifiziert werden konnten, die in der Expression abnormer FHR5 Varianten resultieren (80, 92, 93), ist über die genaue Rolle von FHR5 bei der Pathogenese von C3G bis dato wenig bekannt. Darüber hinaus ist die physiologische Funktion von FHR5 und dessen Funktion in der Immunhomöostase ebenfalls noch nicht vollständig verstanden. Kürzlich wurde gezeigt, dass FHR5 vorwiegend an verändertes Wirtsmaterial bindet, dort als Ankerpunkt für den Komplementaktivator Properdin dient und auf diese Weise eine Plattform zur Aktivierung der Kaskade bereitstellt (77).

Ziel dieser Arbeit war es, ein tieferes Verständnis der Rolle von FHR5 bei der Pathogenese von C3G zu erlangen und parallel Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Proteins im gesunden Organismus zu ziehen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Deposition von FHR5 in Glomeruli von C3G Patienten näher untersucht und die FHR5 Konzentration im Serum von Patienten quantifiziert. Es wurden anschließend potentielle Bindungspartner von FHR5 charakterisiert, welche die intraglomeruläre Ablagerung bei C3G vermitteln könnten und so eine erhöhte Komplementaktivität im erkrankten Nierengewebe begünstigen. Aufgrund seiner komplementaktivierenden Wirkung wurde weiterhin untersucht, ob und inwiefern FHR5 humane Monozyten beeinflusst und damit zelluläre Teile des angeborenen Immunsystems moduliert. Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob FHR5 einen schädigenden Effekt auf humane Nierenzellen ausübt und auf diese Weise renale Schäden induziert beziehungsweise verstärkt. Die erzielten Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der komplexen und schwerwiegenden Nierenerkrankung C3G beitragen und die Entwicklung von potentiellen Therapieansätzen positiv beeinflussen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Wenn nicht explizit vermerkt, wurden alle gängigen Verbrauchskemikalien und Reagenzien von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) oder Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) bezogen. Aus Gründen der Übersicht wurde in den folgenden Tabellen auf die kursive Schreibweise der englischsprachigen Begriffe verzichtet.

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Anbieter
Albumin Fraction V	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Page-Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
TMB Plus2 Substratlösung	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup Dänemark

Tabelle 2: Geräte und Software

Gerät	Anbieter
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
BD LSR II Durchflusszytometer	BD, Heidelberg, Deutschland
BLitz® System	Pall ForteBio, Portsmouth, U.K
BLitz® Pro Software	Pall ForteBio, Portsmouth, U.K
Casy® Cellcounter	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Consort E844 Power Supply	Consort bvba, Turnhout, Belgien
FlowJo® FACS Analyse Software	FLOWJo LLC, Ashland, USA
Fusion FX System	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
FusionCapt Advance FX7	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Glass Econo-Column®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
HeraSafe Sicherheitswerkbank	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
HeraCell Zellinkubator	Heraeus Instruments GmbH und Co. KG, Gera, Deutschland
Innova44 Schüttelinkubator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MD12 Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Mini Protean® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Stuart™ Roller Mixer SRT1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tecan Safire2	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortex Genie 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zeiss LSM 710 Confocal Microscope	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
ZEN 2009 Microscopy Software	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Zentrifugen 5415D/5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen Sigma 3-18 K/3-18KS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 3: Kommerzielle Kits

Kit	Anbieter
C3a Plus MicroVue™ Quidel®	TECOmedical GmbH, Bünde, Deutschland
Human CFHR5 ELISA	RayBiotech Life, Norcross, Georgia, USA
Human IL-10 DuoSet ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Pan Monocyte Isolation Kit	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
TNFα Human Uncoated ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Tabelle 4: Nährmedien

Medium/Lösung	Zusammensetzung
LB-Agar	10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l BactoYeast, 10 g/l NaCl, 20 g/l Agar, pH 7,5
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l BactoYeast, 10 g/l NaCl, pH 7,5
SOC-Medium	1 M Sorbitol, 0,35 % Hefeextrakt, 0,70 % Trypton, 6,5mM CaCl ₂

Tabelle 5: Primärantikörper/-seren

Antikörper/-seren (Klonalität, ggf. Klon)	Anbieter
E014 (135) (monoklonal)	Arbeitsgruppe Prof. Binder, Wien, Österreich
IgM-Isotyp-Kontrolle (monoklonal, Klon MM-30)	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
M16 (60) (monoklonal)	Im Haus generiert
NA17 (136) (monoklonal)	Arbeitsgruppe Prof. Binder, Wien, Österreich
Kaninchen anti-human C3d (polyklonal)	Dako, Glostrup, Dänemark
Maus anti-human c-myc (monoklonal, Klon 9E10)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Ziege anti-human C3 (polyklonal)	Complement Technology, Inc., Tyler, Texas, USA
Ziege anti-human FHR5 (polyklonal)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Tabelle 6: Proteine

Protein	Anbieter
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
C3b	Complement Technology, Inc., Tyler, Texas, USA
Faktor H und Faktor I	Complement Technology, Inc., Tyler, Texas, USA
FHR2	Im Haus generiert
FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten	Im Haus generiert
FHR5 kommerziell	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
FHR2 ₁₋₂ -FHR5	Im Haus generiert
Laminin-521	BioLamina AB, Sundbyberg, Sweden
MAA-BSA und sh-BSA	Arbeitsgruppe Prof. Binder, Wien, Österreich
Properdin	Complement Technology, Inc., Tyler, Texas, USA

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer BLItz	0,05% Gelatine in DPBS
Blockpuffer ELISA	2% BSA, 0,1 % Tween in DPBS
Blockpuffer Western Blot	1 % BSA, 4 % Milchpulver, 0,1 % Tween in DPBS
Blotpuffer (10x)	250 mM Trisbase, 192 mM Glycin, ddH ₂ O
Entwicklerlösung Silberfärbung	0,015 % Formaldehyd, 3 % Na ₂ CO ₃ *10H ₂ O, 0,001 % Na ₂ S ₂ O ₃ , ddH ₂ O
FACS Waschpuffer	2 % BSA in DBPS ⁺⁺
Fixierlösung Silberfärbung	30 % Ethanol, 30 % Essigsäure in ddH ₂ O
Laufpuffer (10x)	25 mM Trisbase, 190 mM Glyzin, 1 % SDS, ddH ₂ O
Mg-EGTA Puffer	20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl ₂ , 10 mM EGTA, ddH ₂ O, pH 7.4
Natriumphosphatpuffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 10 mM, NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O, 500 mM NaCl, ddH ₂ O, pH 8
PBS II (10x)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , ddH ₂ O, pH 7,4
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris Base, 2,5 mM SDS, ddH ₂ O, pH 6,8
Sensibilisierungslösung Silberfärbung	0,2 % Na ₂ S ₂ O ₃ in ddH ₂ O
Silbernitratlösung	0,2 % AgNO ₃ in ddH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base, 15 mM SDS, ddH ₂ O, pH 8,8

Waschpuffer ELISA	0,1% Tween in DPBS
Waschpuffer Western Blot	0,1% Tween, 10% 10xPBSII in ddH ₂ O
Western-Transfer-Puffer	10 % 10x Blotpuffer, 20 % Methanol in ddH ₂ O

Tabelle 8: Sekundärantiseren und Farbstoffe

Antikörper	Anbieter
Annexin V (FITC-konjugiert)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Kaninchen anti-Ziege (HRP-konjugiert)	Dako, Glostrup, Dänemark
Ziege anti-Kaninchen (HRP-konjugiert)	Dako, Glostrup, Dänemark
Ziege anti-Maus (HRP-konjugiert)	Dako, Glostrup, Dänemark
Ziege anti-Maus (Alexa647®-konjugiert)	Cell Signaling Technology, Camebridge, Großbritannien
Ziege anti-Maus (Alexa488®-konjugiert)	Invitrogen, Karlsruhe, Detuschland
Streptavidin (HRP-konjugiert)	Amersham Life Science, Amersham, UK
Viability Dye 780	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Vybrant® DiD Cell-Labeling Solution	Invitrogen, Karlsruhe, Detuschland
Vybrant® DiO Cell-Labeling Solution	Invitrogen, Karlsruhe, Detuschland
Weizenkeimagglutinin (TexasRed™-X-konjugiert)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Tabelle 9: Seren

Serum	Anbieter
Normales humanes Serum (NHS)	Im Haus generiert
FHR1/FHR3-defizientes Serum	Im Haus generiert

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Material	Anbieter
Amersham™ Protran™ Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Einwegkanülen und -spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einwegpipetten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
MaxiSorp™ 96-Well-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Ni-NTA Biosensoren	Pall ForteBio, Portsmouth, U.K

Objektträger SuperFrost®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protein LoBind Tubes (0,5 und 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pierce Protein Concentrators	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
Zellkulturplatten 24-, 48- und 96-Well	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellkulturflaschen T25 Cell+	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten 48- und 96-Well Cell+	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 11: Zellkulturmedien/-lösungen

Medium/Lösung	Anbieter
Bicoll	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Accutase	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
DMEM	Lonza, Wuppertal, Deutschland
DPBS	Lonza, Wuppertal, Deutschland
DPBS ⁺⁺ (mit Calcium und Magnesium)	Lonza, Wuppertal, Deutschland
Fetales Rinderserum	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Gentamycin Sulfat	Lonza, Wuppertal, Deutschland
IMDM Medium	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Mesangial Cell Medium Kit (MsCM)	Innoprot, Derio – Bizkaia, Spanien
Percoll TM	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Poly-L-Lysin	Innoprot, Derio – Bizkaia, Spanien
Primary Cells Detach Kit	Innoprot, Derio – Bizkaia, Spanien
RPMI 1640	Lonza, Wuppertal, Deutschland
Ultraglutamin	Lonza, Wuppertal, Deutschland

Tabelle 12: Zelllinien und Buffy-Coats

Zellen	Anbieter
--------	----------

HEK293-Zellen (ACC 305)	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Human Renal Mesangial Cells (HRMC)	Innoprot, Derio – Bizkaia, Spanien
HUVEC-Zellen (ATCC® CRL-1730™)	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Buffy-Coats (Monozytenisolation)	Universitätsklinikum Jena, Jena, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Primärzellen

3.2.1.1 Primäre humane Mesangialzellen (HRMC)

Die primären Mesangialzellen wurden gemäß Herstellerangaben in Kultur gebracht und in speziellem Kulturmedium (MsCM) bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Die Zellen wurden gemäß Herstellerangaben unter Verwendung eines *Primary Cells Detach Kits* passagiert.

3.2.1.2 Humane Monozyten

Humane Monozyten wurden aus *Buffy Coats* von gesunden Donoren isoliert. Zuerst wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die Isolation der reinen Monozyten erfolgte im Anschluss durch negative Selektion unter Verwendung eines kommerziellen Kits gemäß Herstellerangaben. Nach der Isolation wurden die Monozyten in RPMI Medium (mit 25 µg/ml Gentamycinsulfat und 2 mM Ultraglutamin) aufgenommen und umgehend für weitere Versuche verwendet.

3.2.2 Zelllinien

3.2.2.1 HEK293

Die humanen embryonalen Nierenzellen wurden in RPMI-1640 (mit 10% FBS, 25 µg/ml Gentamycinsulfat und 2 mM Ultraglutamin) bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Nach Erreichen der entsprechenden Konfluenz wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst, zentrifugiert und in frischem Medium ausgesät.

3.2.2.2 HUVEC

Die humanen Endothelzellen wurden in DMEM (mit 10% FBS, 25 µg/ml Gentamycinsulfat und 2 mM Ultraglutamin) ebenfalls bei einer Temperatur von 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen der entsprechenden Konfluenz wurden die Zellen unter Verwendung von Accutase passagiert.

3.2.3 Transformation von *E.coli* Zellen und DNA-Aufreinigung

Chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen (hergestellt von Monika von der Heide, Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) wurden zunächst mit Plasmid-DNA vermischt. Die Plasmide mit den für FHR5 oder die Deletionsmutanten kodierenden Sequenzen (Ausgangsvektor pcDNA™4/TO/myc-His B) wurden im Rahmen vorhergehender Arbeiten durch ortsgerichtete Mutagenese kloniert (Doktorarbeiten von Dr. Qian Chen und Dr. Ulrike Senftleben sowie Masterarbeit von Ramona Rudnick, Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena (83, 137, 138)). Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis wurden die Ansätze für 45 s (42°C) erhitzt und danach für 2 min abgekühlt. Nach Zugabe von SOC-Medium erfolgte die Inkubation bei 37°C (1 h). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen auf Ampicillin (0,1 mg/ml) enthaltenden LB-Agar Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien in Ampicillin (0,1 mg/ml) enthaltendem LB-Medium als Flüssigkultur weiterkultiviert. Nach 8 h (37°C, 180 rpm) Inkubationszeit wurde die Hauptkultur in LB-Medium (mit 0,1 mg/ml Ampicillin) angesetzt. Die Hauptkultur wurde für ca. 16 h bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits gemäß Herstellerangaben.

3.2.4 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen und Expression von FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten

Am Tag vor der Transfektion wurden 1×10^7 Zellen pro Kulturflasche (T175) ausgesät und über Nacht kultiviert. Nachdem die Konfluenz lichtmikroskopisch überprüft wurde, wurden pro Transfektionsansatz zunächst 30 µg der jeweiligen Plasmid-DNA mit 60 µg Polyethylenimin-Lösung vereinigt und nach 25 min Inkubationszeit tropfenweise zum Medium hinzugefügt. Nachdem die Zellen für 16 h kultiviert wurden, wurde das Transfektionsmedium durch frisches, serumfreies RPMI-1640 substituiert. Die erste Überstandsammlung erfolgte 96 h nach der Transfektion. Anschließend wurde frisches, serumfreies Medium zugegeben. Nach 192 h wurden die Überstände nochmals abgenommen.

3.2.5 Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Um Zellreste zu entfernen, wurde der proteinhaltige Überstand zunächst zentrifugiert und anschließend im Verhältnis 1:1,5 mit Natriumphosphatpuffer (mit 5 mM Imidazol) verdünnt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,6 wurden, in Natriumphosphatpuffer equilibrierte, HisPur™-Ni-NTA-Beads zugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit bei 4°C wurde der Überstand auf eine Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nach

zwei Waschschritten (Natriumphosphatpuffer mit 10 bzw. 25 mM Imidazol) erfolgte die Elution der Proteine schrittweise mit 700 mM Imidazol enthaltendem Natriumphosphatpuffer. Es wurden hierbei neun Fraktionen (je 1 ml) aufgefangen, welche anschließend vereinigt und mit Hilfe eines Konzentrators gemäß Herstellerangaben auf ein Endvolumen von ca. 200 µl konzentriert wurden. Um den Austausch des imidazolhaltigen Puffers gegen DPBS zu gewährleisten, wurden jeweils 5 ml steriles DPBS auf den Konzentrator gegeben und anschließend gemäß Herstellerangaben konzentriert. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Das für diese Arbeit verwendete rekombinante FHR2 wurde, wie kürzlich beschrieben (74), im *Pichia pastoris* System exprimiert und anschließend aufgereinigt (Alexandra Rülke, Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena).

3.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurde das diskontinuierliche Elektrophorese-Verfahren angewendet. Zu diesem Zweck wurden Polyacrylamid-Gele hergestellt, welche sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammensetzten. Vor der Gelbeladung wurden die Proben zunächst mit reduzierendem Ladebuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt (reduzierende Bedingungen).

3.2.7 Western Blot

Für die Durchführung eines Western Blots wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese zunächst mittels *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran nach dem Transfer für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht (ü.N.) mit dem primären Antikörper/-serum (4°C) wurde die Membran intensiv mit Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem jeweiligen HRP-gekoppelten Sekundäntiserum bei Raumtemperatur (RT) für mindestens 1 h. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz gemäß Herstellerangaben. Die Entwicklung sowie Kontrastanpassungen wurden mit Hilfe des Fusion Fx Systems durchgeführt.

3.2.8 Silberfärbung

Für die unspezifische Proteinfärbung wurden die Polyacrylamid-Gele nach der Gelelektrophorese für 30 min bei RT oder ü.N. bei 4°C in Fixierlösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte die Sensibilisierung (1 min) mit Natriumthiosulfatlösung. Nach der Sensibilisierung wurden die Gele kurz gewaschen und anschließend für 20 min in Silbernitratlösung gefärbt. Um Reste der Lösung zu entfernen, wurden die Gele nach der Färbung gründlich mit ddH₂O gespült. Zur Detektion der Proteine wurden die Gele in Entwicklerlösung entwickelt bis die Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fixierlösung gestoppt.

3.2.9 *Biolayer Interferometry* (BLItz®)

Die Bindungsaffinität zwischen FHR5 und MAA-BSA wurde mittels *Biolayer Interferometry* bestimmt. Hierzu wurde FHR5 (20 µg/ml in DPBS) über den C-terminalen *His-Tag* für 240 s an Ni-NTA Biosensoren gebunden. Nachdem die unspezifischen Bindestellen mit Blockpuffer blockiert wurden (120 s), wurde MAA-BSA in verschiedenen Konzentrationen (72, 36, 18, 9, 45 µM) appliziert. Die Assoziationsphase wurde für 240 s verfolgt. Im Anschluss an die Assoziationsphase wurde die Dissoziation in DPBS für weitere 240 s gemessen. Als Negativkontrolle wurde sh-BSA (sham treated-BSA) verwendet. Der K_D-Wert wurde mit Hilfe der BLItz® *Pro Software* berechnet.

3.2.10 *CellTiter-Blue*®-Assays

Zur Untersuchung der Zellschädigung wurden humane Mesangialzellen in einer 96-Well Platte (1x10⁴ Zellen pro Well) ausgesät und für zwei Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach lichtmikroskopischer Prüfung der Konfluenz wurde das verbrauchte Kulturmedium zunächst verworfen. Anschließend wurde frisches Medium (Kontroll-Wells), Medium mit FHR5 (3; 5; 7,5; 10; 15; und 20 µg/ml) und Medium mit PBS (Volumen entsprechend der jeweiligen FHR5 Konzentration) zu den adhären Zellen gegeben. Für eine weitere Untersuchung wurde Medium mit NHS (2,5; 5 und 10 %) in An- oder Abwesenheit von FHR5 (10 µg/ml) oder PBS appliziert. Um die Basisvitalität der Zellen zu ermitteln, wurde Medium ohne NHS und FHR5 bzw. PBS in die entsprechenden Kontroll-Wells gegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Medium zunächst durch *CellTiter-Blue*®-Substratlösung ersetzt. Nach weiteren 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurde der Farbumschlag photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert, da nur lebende Zellen durch ihre metabolische Aktivität in der Lage sind, blaues Resazurin zu rötlichem Resofurin zu reduzieren. Zur Auswertung wurden die OD-

Werte der jeweiligen Kontroll-Wellen gemittelt und auf 100 % gesetzt. Die Vitalität der behandelten Zellen wurde anschließend anhand dieser Kontrollen ermittelt. Die photometrische Auswertung der *CellTiter-Blue*[®]-Assays wurde freundlicherweise von Dr. Hans-Martin Dahse (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) unterstützt.

3.2.11 ELISA-Techniken

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die entsprechenden Proteine entweder ü.N. bei 4°C oder für mindestens 1 h bei 37°C auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde die Platte für mindestens 1 h mit Blockpuffer bei 37°C inkubiert. Alle Kavitäten wurden zwischen den einzelnen Schritten jeweils dreimal gründlich gewaschen. Sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper/-serum wurden für 1 h bei RT auf der Platte inkubiert. Die Entwicklung der ELISAs erfolgte durch Zugabe von TMB Plus2 Substratlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure (2 N) gestoppt. Anschließend wurde die Absorbanz photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Für die Zytokin-Analysen wurde die Absorbanz unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Wellenlänge gemessen.

3.2.11.1 Analyse der FHR5-Serumspiegel

Die Quantifizierung der FHR5 Spiegel in humanem Serum erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits gemäß Herstellerangaben. Es wurde Serum von gesunden Donoren sowie von zufällig ausgewählten C3G Patienten für die Analyse verwendet. Die Proben wurden vor der Applikation 1:75 verdünnt.

3.2.11.2 Nachweis von FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten

FHR5 und die FHR5 Deletionsmutanten (5 µg/ml in DPBS) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen erfolgte die Detektion mittels des monoklonalen c-myc Antikörpers in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundäriserum.

3.2.11.3 FHR5, FHR2₁₋₂-FHR5 und FHR2 Bindung an MAA-BSA

Die dosisabhängige Bindung von FHR5 an MAA-BSA wurde mit Hilfe zweier unterschiedlicher Setups untersucht. Einerseits wurden MAA-BSA und sh-BSA in konstanter

Konzentration (10 µg/ml in DPBS) immobilisiert und aufsteigende Konzentrationen von FHR5 (2,5; 5; 7,5 und 10 µg/ml in DPBS) als Bindungspartner zu den beschichteten Kavitäten gegeben. Andererseits wurden MAA-BSA und sh-BSA in aufsteigenden Konzentrationen (2,5; 5; 7,5; 10 µg/ml in DPBS) immobilisiert und FHR5 in konstanter Konzentration (3 µg/ml in DPBS) hinzugegeben. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte in beiden Fällen mittels des monoklonalen c-myc Antikörpers in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärintiserum. Die Untersuchung der dosisabhängigen Bindung von FHR2 (2,5; 5; 7,5 und 10 µg/ml) an immobilisiertes MAA-BSA bzw. sh-BSA (10 µg/ml in DPBS) erfolgte ebenfalls unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärintiserum.

Um die Intensität der Bindung von Wildtyp-FHR5 und der C3G-assoziierten FHR5 Variante FHR2₁₋₂-FHR5 an MAA-BSA zu vergleichen, wurden MAA-BSA und sh-BSA (10 µg/ml in DPBS) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden FHR5 und FHR2₁₋₂-FHR5 (5 µg/ml in DPBS) appliziert und für 1 h bei 37°C gebunden. Die Detektion der Bindung erfolgte wie oben beschrieben. Dieser Versuch wurde von Julian Matthes (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) durchgeführt und im Rahmen seiner Bachelorarbeit veröffentlicht (139).

Zum Nachweis der FHR5 Bindung aus Serum wurden MAA-BSA und sh-BSA (10 µg/ml in DPBS) immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde NHS bzw. FHR1/FHR3-defizientes Serum (10 % in DPBS) in die jeweiligen Kavitäten pipettiert. Die Detektion von gebundenem FHR5 erfolgte mittels eines polyklonalen FHR5 Antiserum in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärintiserum.

3.2.11.4 FHR5 Bindung an Laminin

Laminin-521 oder Gelatine (10 µg/ml in DPBS) wurden zunächst immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurden FHR5 und die Deletionsmutanten (50 nM in DPBS) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit dem monoklonalen c-myc Antikörper in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärintiserum detektiert.

3.2.11.5 Kompetetion zwischen Volllängen-FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten um die Bindung an MAA-BSA oder Laminin-521

MAA-BSA und Laminin-521 (10 µg/ml in DPBS) wurden auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde biotinyliertes Volllängen-FHR5 (75 nM in DPBS) mit aufsteigenden Konzentrationen der Deletionsmutanten FHR₁₋₂ und FHR₅₋₇ (0-75 nM) versetzt und zu den jeweiligen Vertiefungen gegeben. Nach der Inkubationszeit bei 37°C (1 h) wurde gebundenes FHR5 über HRP-gekoppeltes Streptavidin detektiert. Die Biotinylierung von FHR5 wurde mittels EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.11.6 Kompetetion zwischen FHR5 und Faktor H um die Bindung an MAA-BSA

Zur Untersuchung der Kompetetion zwischen FHR5 und Faktor H um die Bindung an MAA-Epitope wurde zunächst eine Mikrotiterplatte mit MAA-BSA und sh-BSA (10 µg/ml in DPBS) beschichtet. Nach einem Blockierschritt wurden FHR5 bzw. BSA (5-15 µg/ml) mit aufgereinigtem Faktor H (250 nM in DPBS) oder hitzeinaktiviertem Serum (20 % in DPBS) vermischt und die Lösungen in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Die Hitzeinaktivierung des Serums erfolgte durch 30 minütige Inkubation bei 56 °C. Die Faktor H Bindung wurde mittels des monoklonalen Antikörper M16 (60) in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärintiserum detektiert.

3.2.11.7 Komplementaktivierungsassay I (C3-Fragmentablagerung)

Um den aktivierenden Einfluss des FHR₂₁₋₂-FHR5 Hybridproteins auf MAA-Epitopen nachzuweisen, wurde Serum eines C3G Patienten mit komplementaktivem NHS (jeweils 5 % Serum in Mg-EGTA Puffer) vermischt und nach einem Blockierschritt zu immobilisiertem MAA-BSA bzw. sh-BSA (5 µg/ml in DPBS) gegeben. Zum Vergleich wurde NHS (10 % in Mg-EGTA Puffer) ohne Patientenserum appliziert. Nach 40 min Inkubation bei 37°C wurden die abgelagerten C3-Aktivierungsfragmente durch Zugabe eines C3d spezifischen polyklonalen Antiserums in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärintiserum detektiert.

Um den Einfluss von MAA-gebundenem FHR5 auf die Komplementaktivität zu untersuchen, wurden zunächst ebenfalls MAA-BSA und sh-BSA (5 µg/ml in DPBS) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach einem Blockierschritt wurden FHR5, FHR₅₋₇ bzw. BSA (200 nM in DPBS) zu den jeweiligen Vertiefungen gegeben und für 1 h bei RT gebunden. Nach sorgfältigem Waschen wurde NHS (2 % in Mg-EGTA Puffer) zugegeben und die Platte anschließend für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion der

abgelagerten C3-Aktivierungsfragmente erfolgte wie oben beschrieben. Zu Kontrollzwecken wurde der Versuch zusätzlich mit hitzeinaktiviertem Serum durchgeführt.

Zur Demonstration der komplementaktivierenden Wirkung von Laminin-gebundenem FHR5 wurden Laminin und Gelatine (10 µg/ml in DPBS) immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurden FHR5, Faktor H, FHR2 bzw. BSA (200 nM in DPBS) für 1 h bei RT gebunden. Nach Waschen der Platte wurde komplementaktives oder hitzeinaktiviertes NHS (10 % in Mg-EGTA Puffer) zugegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion der abgelagerten Fragmente erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.11.8 Komplementaktivierungsassay II (C3a Generierung)

Um die C3a Freisetzung in Gegenwart von MAA-gebundenem FHR5 zu messen, wurden die ersten Schritte wie unter dem vorherigen Punkt beschrieben durchgeführt. Nach Inkubation der Platte mit NHS (40 min, 37°C) wurden die Überstände abgenommen und mit Hilfe eines kommerziellen C3a Kits analysiert.

3.2.11.9 Zytokin-Analytik

Um den Einfluss von FHR5 auf humane Monozyten zu untersuchen, wurden FHR5, Faktor H bzw. BSA (5 µg/ml in DPBS) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Im Anschluss wurden frisch isolierte Monozyten (in RPMI Medium mit 10 % NHS) in An- oder Abwesenheit von Lipopolysaccharid (LPS, 5 ng/ml) zugegeben. Die Platte wurde anschließend für 20 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die TNFα und IL-10 Konzentrationen in den Überständen wurden mit Hilfe von kommerziellen Kits gemäß Herstellerangaben gemessen. Vor der Probenapplikation wurden die Überstände entweder 1:50 (TNFα) bzw. 1:10 (IL-10) verdünnt.

3.2.12 CEWA – Kombinierte ELISA und Western Blot Analysen

3.2.12.1 Bindung von Serum FHR5 und FHR2₁₋₂-FHR5 an MAA-BSA

Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit MAA-BSA und sh-BSA (10 µg/ml in DPBS) beschichtet. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde NHS oder Serum eines C3G Patienten (je 20% in DPBS) in die jeweiligen Vertiefungen gegeben. Nach der Inkubation (ü.N., 4°C) wurde die Platte zunächst gründlich gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Proteine mit erhitztem reduzierenden Ladepuffer bei 56°C. Nach

Auftrennung der Proteine via Gelelektrophorese wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels polyklonalem FHR5 Antiserum in Kombination mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantiserum.

3.2.12.2 Inhibition der Faktor H-Kofaktoraktivität auf einer MAA-BSA beschichteten Oberfläche durch FHR5

MAA-BSA oder sh-BSA (10 µg/ml in DPBS) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Im Anschluss an den Blockierschritt wurde zunächst FHR5 (20 µg/ml in DPBS) und anschließend Faktor H (50 µg/ml in DPBS) appliziert. Nach jeweils 1 h Inkubationszeit (37°C) wurde ein Mastermix aus C3b und Faktor I (140 nM und 220 nM in DPBS) hinzugegeben. Im Anschluss an eine weitere Inkubationszeit (1h, 37°C) wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt, die Überstände unter reduzierenden Bedingungen auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel geladen und die Proteine per Elektrophorese getrennt. Die Detektion der C3-Fragmente erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen C3 Antiserums in Kombination mit dem geeigneten HRP-gekoppelten Sekundärantiserum.

3.2.13 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

3.2.13.1 Bindung von FHR5 an nekrotische HUVECs

Einen Tag vor dem Experiment wurde das serumhaltige durch serumfreies Kulturmedium ersetzt. Nachdem die HUVECs am Versuchstag geerntet wurden, wurde die Nekrose durch Hitzeweinwirkung induziert (65°C, 700 rpm, 1 h). Die nekrotischen Zellen wurden anschließend für 30 min mit FHR5 (20 µg/ml in DPBS) inkubiert. Es wurde zusätzlich ein Ansatz ohne FHR5 (nur DPBS) als Antikörperkontrolle mitgeführt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit einem monoklonalen c-myc Antikörper in Kombination mit dem entsprechenden Alexa488®-konjugierten Antiserum gefärbt. Darüber hinaus wurden der Zellkern mit DAPI und die Zellmembran mit Weizenkeimagglutinin (WGA)-TexasRed™-X visualisiert. Die Auswertung erfolgte konfokal-mikroskopisch am Zeiss LSM 710 *Confocal Microscope* unter Verwendung der ZEN 2009 *Microscopy Software*. Kontrastanpassungen wurden, wenn nötig, bei der Antikörperkontrolle und der behandelten Probe in gleichem Maß vorgenommen.

3.2.13.2 Nachweis von MAA-Epitopen auf nekrotischen HUVECs

Für diesen Versuch wurden HUVECs kultiviert und nach dem Ernten durch Hitzeinduktion nekrotisiert (65°C, 700 rpm, 1 h). Anschließend wurden die Zellen mit dem

monoklonalen NA17 (136) Antikörper (natürlicher IgM Antikörper gegen MAA-Epitope) oder einer IgM-Isotyp-Kontrolle inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des entsprechenden Alexa488®-konjugierten Antiserums. Auch hier wurden der Zellkern mit DAPI und die Zellmembran mit WGA-TexasRed™-X visualisiert. Die Auswertung erfolgte wie im vorherigen Punkt beschrieben. Dieser Versuch wurde freundlicherweise von Andrea Hartmann (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) unterstützt.

3.2.14 Durchflusszytometrische Analysen

3.2.14.1 Detektion von MAA-Epitopen auf Zellen

Für den Nachweis von MAA-Epitopen wurden intakte (frisch geerntet) und nekrotische (65°C, 600 rpm, 20 min) HUVECs bzw. primäre humane Mesangialzellen mit dem monoklonalen NA17 (136) oder E014 (135) IgM-Antikörper bzw. einer IgM-Isotyp-Kontrolle inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem entsprechenden Alexa488®-konjugierten Antiserum. Zur Unterscheidung von intakten und toten Zellen wurde der Farbstoff Viability Dye 780 verwendet. Des Weiteren wurden MAA-Epitope auf NHS-behandelten primären Mesangialzellen detektiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst ausgesät und inkubiert. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurde das Kulturmedium verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Dieses wurde zuvor mit aktivem NHS (2,5; 5 und 10 %) versetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und wie oben beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. Um die unspezifische Hintergrundfärbung einzubeziehen, erfolgte die Berechnung der MAA-Epitop-Menge jeweils basierend auf der für jede Probe mitgeführten Antikörperkontrolle. Hierfür wurde der Messwert (MFI, mittlere Fluoreszenzintensität) der jeweiligen IgM-Isotyp-Kontrolle auf 100 % gesetzt und die Erhöhung des Signals mit dem spezifischen Antikörper für jede Bedingung berechnet.

3.2.14.2 MAA-Inhibitionsexperiment

Um zu prüfen, ob FHR5 über MAA-Epitope an modifizierte Zellen bindet, wurde rekombinantes FHR5 (20 µg/ml in DPBS) mit MAA-BSA, sh-BSA (20 µg/ml) bzw. DPBS vorinkubiert (1 h bei 32°C). Anschließend wurden die jeweiligen Lösungen mit nekrotischen HUVECs (hitzeinduzierte Nekrose: 65°C, 700 rpm, 1 h) für 40 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die FHR5 Bindung unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers in Kombination mit dem entsprechenden Alexa488®-konjugierten Antiserum detektiert. Die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Viability Dye 780. Die Berechnung der MAA-Epitop-Menge erfolgte

basierend auf der jeweiligen Antikörperkontrolle. Hierfür wurde der MFI-Wert der jeweiligen IgM-Isotyp-Kontrolle auf 100 % gesetzt und die Steigerung des Signals mit dem spezifischen Antikörper für jede Bedingung berechnet.

3.2.14.3 Immunodepletion von apoptotischen Jurkat Zellen

Dieser Versuch wurde von Dr. Nikolina Papac-Milicevic im Rahmen einer Kooperation durchgeführt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christoph Binder, Medizinische Universität Wien). Die Apoptose von Jurkat Zellen wurde durch UVC Bestrahlung (100 mJ pro cm) induziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem MAA-detektierenden monoklonalen IgM-Antikörper LR04 (= LR04-n Fraktion) bzw. einer IgM-Isotyp-Kontrolle (= IC-n Fraktion) behandelt. Nach gründlichem Waschen wurden die Zellen mit IgM-*Microbeads* inkubiert und mit Hilfe einer MS MACS Säule in MAA^{high} (IC-n) und MAA/MDA^{low} (LR04-n) Zellfraktionen separiert. Nach durchflusszytometrischer Kontrolle (LR04, IgM-Isotyp-Kontrolle, Annexin V PE) wurden die Zellfraktionen mit FHR5 (50 und 100 nM in DPBS) inkubiert. Gebundenes FHR5 wurde im Anschluss mittels eines FHR5 spezifischen Antiserums detektiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.14.4 Einfluss von FHR5 auf die Phagozytose von apoptotischen HUVECs durch humane Monozyten

Einen Tag vor dem Versuch wurde die Apoptose von HUVECs durch Staurosporin induziert. Dafür wurden die HUVECs geerntet, zentrifugiert und anschließend in serumfreiem, Staurosporin-versetztem (20 ng/ml) DMEM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in frische Zellkulturflaschen (T75) überführt und für ca. 16 h im Inkubator inkubiert. Am Versuchstag wurden die apoptotischen Zellen geerntet, mit DiD gefärbt und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Nach der Isolation von Monozyten aus *Buffy Coats* wurden diese zunächst mit DiO gefärbt. Parallel dazu wurden die apoptotischen Endothelzellen für 30 min mit FHR5, Properdin oder BSA (20 µg/ml) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Monozyten in 48-Well Zellkulturplatten (RPMI Medium mit 25µg/ml Gentamycinsulfat, 2 mM Ultraglutamin und 10 % NHS) ausgesät und mit den zuvor beladenen, DiD gefärbten, apoptotischen HUVECs koinkubiert (1:1). Die Koinkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Nachdem die biologischen Prozesse auf Eis abgestoppt wurden, wurden die Überstände verworfen, die Wells mit zimmerwarmem DPBS gespült und die Zellen danach unter Verwendung von eiskalter EDTA-Lösung (10 mM) für ca. 35 min abgelöst. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Proben.

3.2.15 Untersuchung von Nierenbiopsien

3.2.15.1 Nachweis von FHR5 in Nierenbiopsien von C3G Patienten

Dieser Versuch wurde von Kooperationspartnern in Hamburg durchgeführt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thorsten Wiech, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Nierenbiopsien wurden zum Nachweis von FHR5 immunhistochemisch gefärbt. Dafür wurden die Gewebeschnitte (1 μm) deparaffinisiert, rehydriert und vor dem Blockieren der unspezifischen Bindestellen mit Protease vorbehandelt (30 min, 37°C). Anschließend wurden die Schnitte mit einem monoklonalen FHR5 Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Zytochemplus/POLAP100. Nach dem Waschen wurden die Schnitte in Neufuchsin-Naphthol As-Bi-Phosphate Substratlösung gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mittels Hä-malaun nach Mayer.

3.2.15.2 Kolokalisation von FHR5 und Laminin in Nierenbiopsien

Die Kolokalisation von FHR5 und Laminin ($\alpha 5$, $\beta 2$ und $\gamma 2$) wurde mittels *Proximity Ligation* Assay untersucht. Dieser Versuch wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thorsten Wiech durchgeführt (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Es wurde eine Nierenbiopsie eines Lupus Nephritis Patienten der Klasse IV sowie eine Nullstunden Kontroll-Biopsie (Transplantat) untersucht.

3.2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows unter Verwendung des ungepaarten t-Tests (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 FHR5 ist in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert und im Serum erhöht

Um die Rolle von FHR5 bei der Pathogenese von C3-Glomerulopathie (C3G) besser zu verstehen und um neue Biomarker zur Charakterisierung der Erkrankung zu etablieren, wurden Nierenbiopsien von C3G Patienten im Rahmen einer Kooperation immunhistochemisch auf FHR5 Ablagerungen untersucht (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thorsten Wiech, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). FHR5 war in den Biopsien der Patienten vor allem im Mesangium des Glomerulus und entlang der verdickten peripheren Kapillärwände abgelagert (Abbildung 10 A, rote Färbung). Im Tubulointerstitium wurde hingegen kein FHR5 detektiert. Die immunhistochemischen Färbungen deuten auf eine FHR5 Ablagerung entsprechend der Deposits mit hoher Elektronendichte im Mesangium, im subendothelialen Raum (MPGN Muster) und der glomerulären Basalmembran (GBM) hin. Diese Deposits wurden bereits in vorangehenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen lokalisiert. In Nierenbiopsien gesunder Personen konnte kein FHR5 nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

Da FHR5 in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert ist, wurde als nächstes der FHR5 Spiegel im Serum von Patienten mittels ELISA untersucht und mit dem einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die FHR5 Konzentration im Serum von C3G Patienten, gegenüber den gesunden Kontrollen, tendenziell erhöht ist (Abbildung 10 B). Während der FHR5 Spiegel bei den getesteten Patienten im Durchschnitt 3,95 µg/ml betrug, lag er bei den Kontrollpersonen durchschnittlich bei 3,01 µg/ml. Fünf der untersuchten C3G Patienten wiesen dabei einen FHR5 Spiegel von ca. 2 µg/ml im Serum auf, während die Konzentration bei allen anderen Patienten über 4 µg/ml FHR5 im Serum betrug.

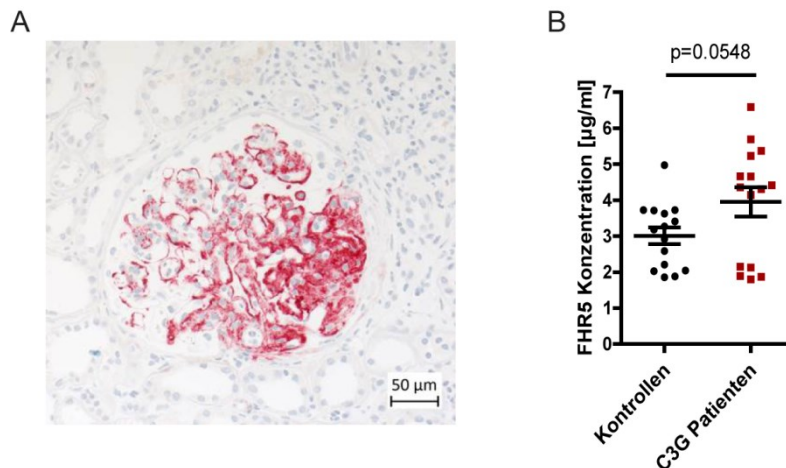


Abbildung 10: FHR5 ist in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert und im Serum erhöht. (A) Zur Untersuchung der FHR5 Deposition in pathologisch veränderten Glomeruli wurden Nierenbiopsien von C3G Patienten immunhistochemisch gefärbt. FHR5 (rot) wurde dabei im glomerulären Mesangium sowie entlang der verdickten Kapillarwände detektiert. Dieses Muster weist auf FHR5 Ablagerungen im Mesangium, im subendothelialen Raum und der glomerulären Basalmembran (GBM) hin. Das oben gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für zehn unterschiedliche Nierenbiopsien. Die Färbungen wurden im Rahmen einer Kooperation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Wiech (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt sowie ausgewertet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. (B) Neben der intraglomerulären Deposition wurde FHR5 mittels ELISA im Serum quantifiziert. Hierzu wurde Serum von 15 C3G Patienten und 15 gesunden Individuen (Kontrollen) analysiert. Die FHR5 Spiegel im Patientenserum ($3,95 \mu\text{g/ml} \pm 0,41$) waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($3,01 \mu\text{g/ml} \pm 0,23$) erhöht. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

4.2 FHR5 bindet über oxidationsspezifische MAA-Epitope an modifizierte Zellen und aktiviert das Komplementsystem auf MAA-exponierenden Oberflächen

4.2.1 Expression von FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten im HEK293-Zellsystem

Die rekombinante Expression von FHR5 und vier Deletionsmutanten (Abbildung 11 A) erfolgte in HEK293-Zellen. Die Konstrukte zur Expression der Deletionsmutanten (pcDNA4FHR5₁₋₂, pcDNA4FHR5₃₋₄, pcDNA4FHR5₅₋₇ und pcDNA4FHR5₈₋₉) wurden in vorausgegangenen Arbeiten durch ortsgerichtete Mutagenese kloniert (Dissertation von Dr. Qian Chen, Dissertation von Dr. Ulrike Senftleben und Masterarbeit von Ramona Rudnick; alle Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena (83, 137, 138)). Nach Amplifikation (*E. coli*) und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte die transiente Transfektion der humanen embryonalen Nierenzellen mittels Polyethylenimin. Die HEK293-Zellen sezernierten die rekombinanten Proteine in das serumfreie Kulturmedium, sodass diese mittels Affinitätschromatographie über den C-terminalen *His-Tag* aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden konnten. Nach der Aufreinigung wurden die Mobilitäten der jeweiligen Proteine mittels Western Blot überprüft (Abbildung 11 B). Hierfür wurde der

monoklonale c-myc Antikörper verwendet, welcher den C-terminalen *myc-Tag* der Proteine detektiert. Sowohl das Volllängenprotein als auch die Deletionsmutanten wurden in den erwarteten Größenbereichen detektiert. Die Gelelektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, weshalb alle Proteine vorwiegend in ihrer monomeren Form vorlagen. Um Antikörpereffekte auszuschließen, wurden FHR5 und die Deletionsmutanten außerdem mit dem monoklonalen c-myc Antikörper mittels ELISA nachgewiesen. Die immobilisierten Proteine wurden mit vergleichbarer Intensität durch den Antikörper detektiert (Abbildung 11 C).

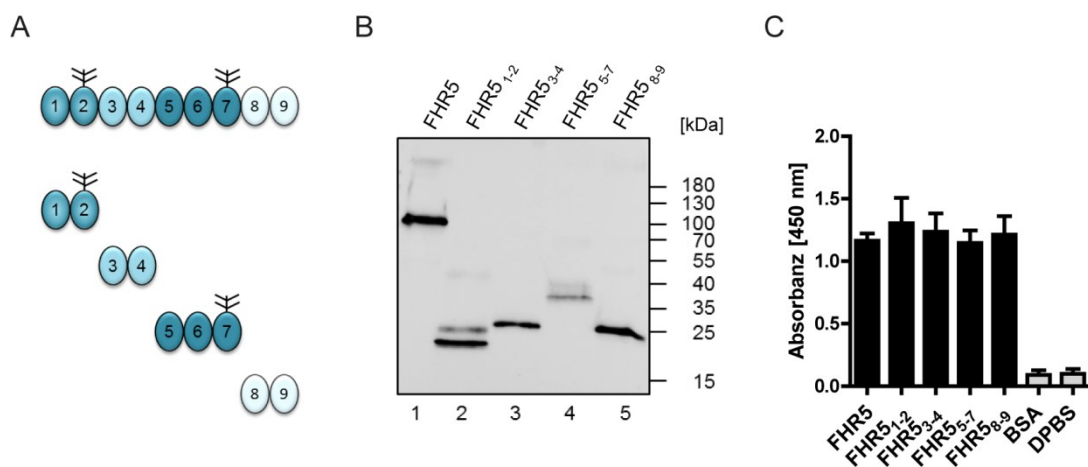


Abbildung 11: Nachweis von rekombinantem FHR5 und FHR5 Deletionsmutanten. (A) Die Abbildung zeigt den modularen Aufbau von FHR5. Das Volllängenprotein FHR5 besteht aus neun SCRs und besitzt zwei Glykosylierungsstellen (SCR 2, SCR 7). Mittels ortsgerichteter Mutagenese wurden im Rahmen vorheriger Arbeiten Deletionsmutanten kloniert, die für unterschiedliche Bereiche des Volllängenproteins kodieren. Dies ermöglicht die separate Expression des N- und C-terminalen Endes (SCRs 1-2 und SCRs 8-9) sowie der beiden Mittelregionen des Proteins (SCRs 3-4 und SCRs 5-7). (B) Nach Transfektion und Aufreinigung wurden FHR5 und die Deletionsmutanten mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers visualisiert. Spur 2 und Spur 4 zeigen jeweils die glykosylierte und nicht glykosylierte Form der Deletionsmutanten FHR5₁₋₂ und FHR5₅₋₇. Aufgrund der reduzierenden Bedingungen während der Gelelektrophorese sind überwiegend monomere Formen sichtbar. Alle Proteine wurden in den erwarteten Größenbereichen detektiert. (C) FHR5 und die Deletionsmutanten (5 µg/ml) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mittels des monoklonalen c-myc Antikörpers im ELISA detektiert. Der Antikörper hat alle Proteine mit vergleichbarer Intensität gebunden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 FHR5 akkumuliert an schadenassoziierten Bereichen modifizierter Zellen

FHR5 bindet verstärkt an apoptotische und nekrotische Wirtszellen (77). Als Bindedomäne für nekrotische Zellen wurde in Vorarbeiten die Mittelregion von FHR5 (SCRs 5-7) identifiziert (83). Durch Visualisierung der FHR5 Bindung an nekrotische HUVECs mittels konfokaler Mikroskopie konnte nun gezeigt werden, dass FHR5 an

charakteristischen Bereichen der Zelloberfläche akkumuliert (Abbildung 12, grünes Fluoreszenzsignal). Hierfür wurden die nekrotischen Zellen mit rekombinantem FHR5 inkubiert und die Bindung mittels des monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. Die Visualisierung der intakten Zellmembran erfolgte mittels Texas-Red™-X-konjugiertem Weizenkeimagglutinin (WGA). Die Regionen an die FHR5 bevorzugt gebunden hat, konnten nicht mit dem Zellmembranmarker WGA (Abbildung 12, rotes Fluoreszenzsignal) angefärbt werden und repräsentieren schadenassoziierte Bereiche mit fehlender Membranintegrität.

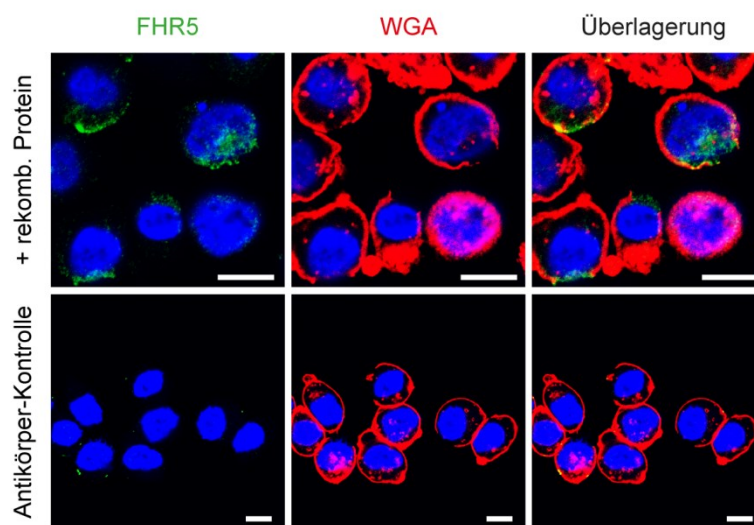


Abbildung 12: FHR5 akkumuliert an spezifischen Bereichen geschädigter Zellen. Die Bindung von FHR5 an nekrotische Zellen wurde mittels konfokaler Mikroskopie unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers visualisiert. Die intakte Membran wurde mit Texas-Red™-X-konjugiertem Weizenkeimagglutinin (WGA, rotes Fluoreszenzsignal) und der Nukleus mit DAPI (blaues Fluoreszenzsignal) detektiert. FHR5 (Alexa-488, grünes Fluoreszenzsignal) akkumulierte spezifisch an WGA-freien Bereichen. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet.

4.2.3 Schadenassoziierte Bereiche modifizierter Zellen exponieren verstärkt oxidationsspezifische MAA-Epitope

MAA-Epitope werden vor allem durch Oxidation von Membranphospholipiden gebildet (140). Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die FHR5 Bindung an geschädigte Bereiche modifizierter Zellen mit der Exposition von MAA-Epitopen korreliert. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden MAA-Epitope durch Konfokalmikroskopie auf der Zelloberfläche geschädigter Zellen lokalisiert (Abbildung 13). Die Detektion der MAA-Epitope erfolgte mit Hilfe eines natürlichen monoklonalen IgM-Antikörpers (NA17), während die Membranintegrität auch bei diesem Experiment mit dem Zellmembranmarker WGA (Abbildung 13, rotes Fluoreszenzsignal) überprüft wurde. MAA-Epitope (Abbildung 13, grünes

Fluoreszenzsignal) wurden dabei ebenfalls vor allem an WGA-freien Bereichen exponiert. FHR5 und MAA-Epitope kolokalisieren somit an schadenassoziierten Stellen modifizierter Zellen.

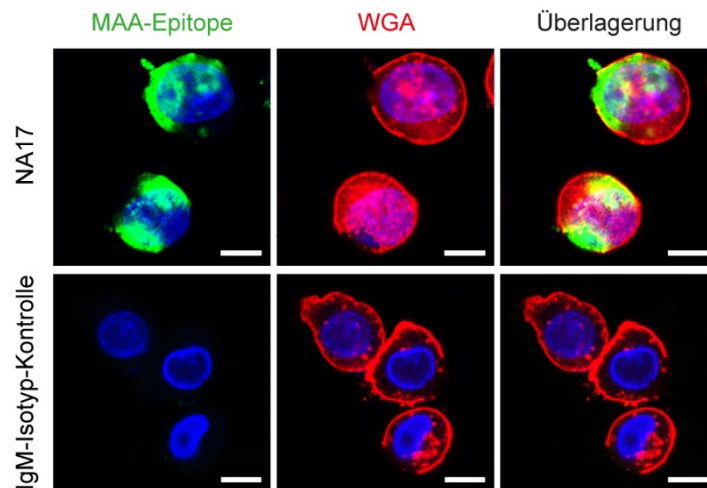


Abbildung 13: MAA-Epitope werden an geschädigten Stellen der Zelloberfläche exponiert. MAA-Epitope (Alexa-488, grünes Fluoreszenzsignal) wurden mittels konfokaler Mikroskopie unter Verwendung des natürlichen IgM-Antikörpers NA17 auf der Oberfläche nekrotischer HUVECs visualisiert. Die intakte Zellmembran wurde mit Texas-Red™-X-konjugiertem Weizenkeimagglutinin (WGA, rotes Fluoreszenzsignal) detektiert. Die MAA-Epitope waren vorwiegend an den WGA-freien Bereichen der Zelloberfläche exponiert. Der Nukleus wurde mit DAPI (blaues Fluoreszenzsignal) angefärbt. Dieses Ergebnis wurde mit freundlicher Unterstützung von Andrea Hartmann (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) generiert. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet.

Da FHR5 nicht an gesunde, sondern bevorzugt an modifizierte Zellen bindet (77), wurde als nächstes die Exposition von MAA-Epitopen auf intakten und nekrotischen Zellen quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden intakte und nekrotische HUVECs sowie primäre humane Mesangialzellen mit MAA-spezifischen IgM-Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass die Zellen ohne vorherige Behandlung (intakt) nur wenige bis keine MAA-Epitope auf ihrer Oberfläche exponierten. Bei beiden Zelltypen stieg die Menge der MAA-Epitope durch Nekrose-Induktion signifikant an (Abbildung 14 A und B).

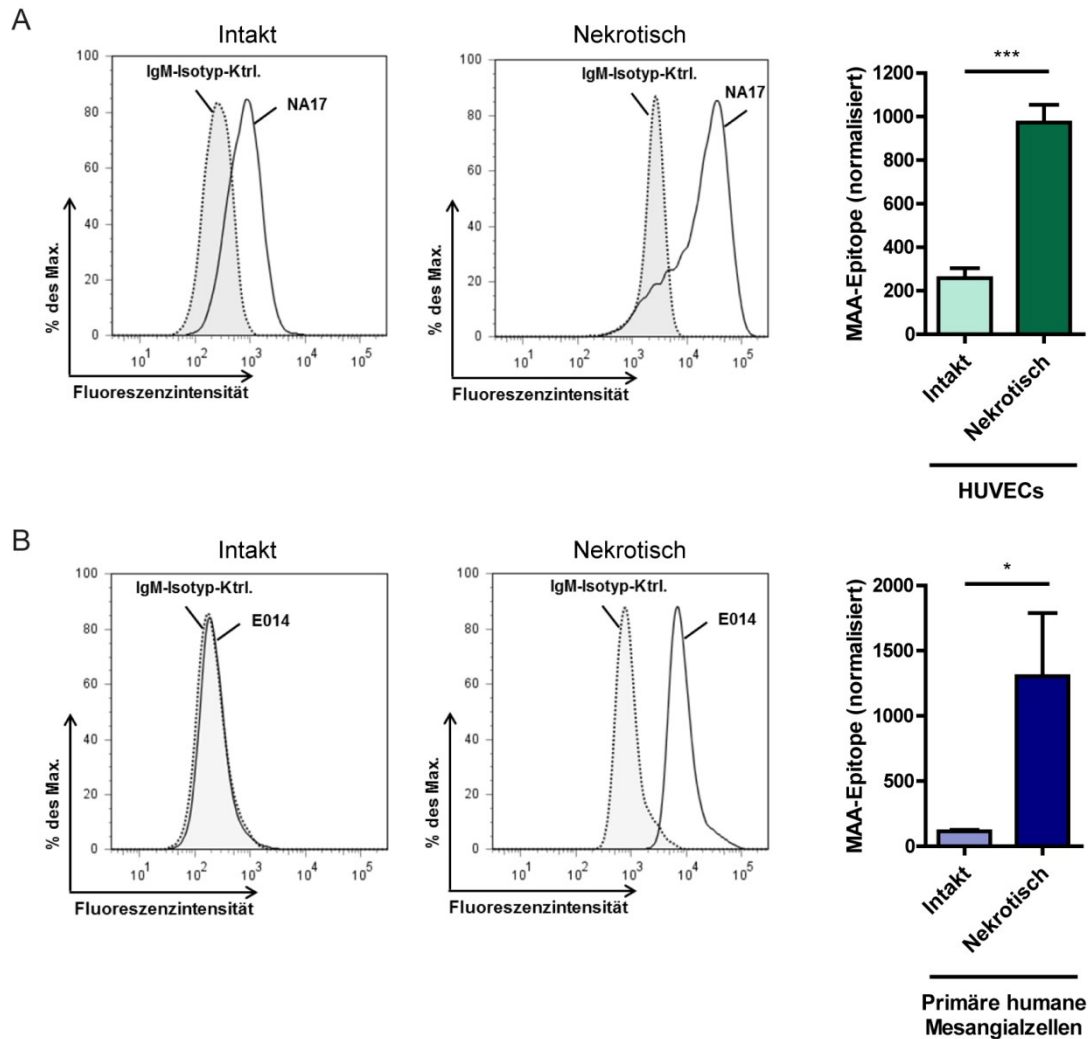


Abbildung 14 MAA-Epitope werden auf nekrotischen HUVECs und primären humanen Mesangialzellen exponiert. (A, B) MAA-Epitope wurden auf intakten und nekrotischen HUVECs (A) sowie primären humanen Mesangialzellen (B) durchflusszytometrisch quantifiziert. In beiden Fällen wurden spezifische monoklonale IgM-Antikörper (NA17 oder E014) verwendet. Sowohl auf intakten HUVECs als auch auf intakten Mesangialzellen wurde nur eine geringe Menge an MAA-Epitopen detektiert. Die Menge der exponierten MAA-Epitope stieg auf nekrotischen Zellen in beiden Fällen signifikant an. Die Histogramme zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die MFI-Werte wurden basierend auf die jeweilige spezifische Antikörperkontrolle normalisiert und im Balkendiagramm dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 FHR5 interagiert mit oberflächengebundenen MAA-Epitopen

FHR5 bindet vorzugsweise an MAA-exponierende Bereiche modifizierter Zellen. Aufgrund dessen wurde die Interaktion von FHR5 und MAA-Epitopen mit Hilfe eines *in vitro* generierten MAA-Addukts (MAA-BSA) genauer charakterisiert. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass FHR5 über die SCRs 5-7 an MAA-BSA bindet (83). In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion beider Moleküle nun genauer untersucht. So konnte durch zwei unterschiedliche ELISA-Setups gezeigt werden, dass die Bindung von FHR5 an MAA-BSA dosisabhängig ist. FHR5 (konstante Konzentration) hat einerseits

dosisabhängig an, in aufsteigenden Konzentrationen immobilisiertes, MAA-BSA gebunden (Abbildung 15 A). Andererseits hat FHR5 auch dann dosisabhängig gebunden, wenn es selbst in aufsteigenden Konzentrationen zu einer MAA-BSA-beschichteten Oberfläche (konstante Konzentration) gegeben wurde (Abbildung 15 B). Die Interaktion von FHR5 und MAA-BSA war spezifisch, da in beiden experimentellen Setups keine Bindung an die Kontrolloberfläche sh-BSA (*sham treated*-BSA) detektiert werden konnte.

Die Affinität der FHR5::MAA Bindung wurde anschließend in Echtzeit mittels *Biolayer Interferometry* bestimmt. Hierfür wurde zunächst rekombinantes FHR5 über den C-terminalen *His-Tag* an nickelbeschichtete Biosensoren gebunden. Nach Zugabe verschiedener MAA-BSA Konzentrationen und Messung der Assoziations- bzw. Dissoziationsphase wurde der K_D -Wert (Dissoziationskonstante) errechnet und die Bindungsstärke auf diese Weise quantifiziert. Die Bindungskurven zeigten ein starkes Assoziationsprofil sowie stabile Komplexe nach Entfernen des Liganden (Abbildung 15 C). Für die FHR5::MAA Interaktion wurde ein K_D -Wert von 20,47 nM errechnet.

Um strukturelle Einflüsse der MAA-bindenden Deletionsmutante FHR₅₋₇ auszuschließen, wurde ein Konkurrenz-Assay durchgeführt. Dafür wurde das Volllängenprotein biotinyliert und danach mit aufsteigenden Konzentrationen der Deletionsmutanten FHR₅₋₇ oder FHR₁₋₂ versetzt. Anschließend wurden die Lösungen auf eine MAA-BSA beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und die Bindung des Volllängenproteins über die Streptavidin-Interaktion detektiert. Die Gegenwart von FHR₅₋₇ führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der FHR5 Bindung an MAA-BSA, wohingegen FHR₁₋₂ keinen Einfluss auf die Bindung hatte (Abbildung 15 D).

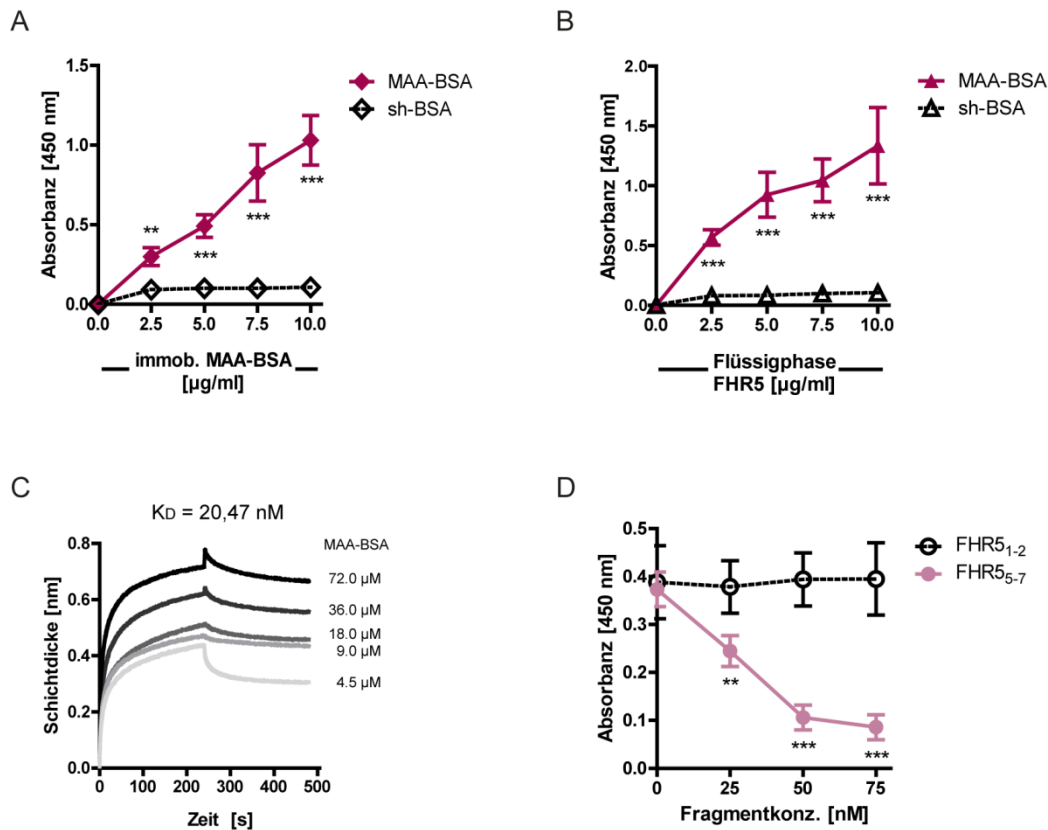


Abbildung 15: FHR5 bindet mit nanomolarer Affinität an MAA-Epitope. (A, B) MAA-BSA und die Negativkontrolle sh-BSA wurden in (A) aufsteigenden (2,5-10 $\mu\text{g/ml}$) oder (B) konstanten (10 $\mu\text{g/ml}$) Konzentrationen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde FHR5 in (A) konstanten (3 $\mu\text{g/ml}$) oder (B) aufsteigenden Konzentrationen (2,5-10 $\mu\text{g/ml}$) als Ligand in der Flüssigphase zugegeben. Die Bindung wurde in beiden Fällen unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. In beiden experimentellen Setups wurde eine dosisabhängige Bindung von FHR5 an immobilisiertes MAA-BSA nachgewiesen. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (C) Die Bindungsaffinität zwischen MAA-BSA und FHR5 wurde in Echtzeit mittels *Biolayer Interferometry* (BLITZ[®]) bestimmt. Dafür wurde FHR5 über den C-terminalen *His-Tag* an einen Ni-NTA Biosensor gebunden. Nach Durchführung eines Blockierschrittes wurde MAA-BSA in den oben dargestellten Konzentrationen zugegeben und die Assoziationsphase für 240 s gemessen. Die Dissoziationsphase wurde ebenfalls für 240 s verfolgt. Der K_D -Wert betrug 20,47 nM. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet. (D) Die Deletionsmutanten FHR₁₋₂ oder FHR₅₋₇ wurden in aufsteigenden Konzentrationen (25-75 nM) mit biotinyliertem Volllänge FHR5 (75 nM) vermischt und auf eine MAA-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Gebundenes FHR5 wurde mittels Streptavidin detektiert. FHR₅₋₇ hat die Bindung von FHR5 dosisabhängig inhibiert. Die Gegenwart von FHR₁₋₂ hatte keinen Effekt auf die Bindung. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da die bisher gezeigten Daten darauf hinweisen, dass FHR5 vor allem über MAA-Epitope an modifizierte Zellen bindet, wurde spekuliert, dass das C3G-assoziierte Hybridprotein FHR₂₋₁₋₂-FHR5 mit höherer Intensität an MAA-Epitope bindet als das Wildtyp-Protein. Diese Hypothese wurde mit Hilfe eines ELISA-basierten Experiments überprüft. MAA-BSA und sh-BSA wurden auf der Oberfläche immobilisiert und mit rekombinantem FHR5 bzw. FHR₂₋₁₋₂-FHR5 inkubiert. Die Bindung wurde unter Verwendung des

monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. Das krankheitsassoziierte Hybridprotein FHR2₁₋₂-FHR5 hat dabei signifikant stärker an MAA-BSA gebunden als das Wildtyp-Protein FHR5 (Abbildung 16 A). Um den Einfluss von FHR2 bei der Bindung des Hybridproteins auszuschließen, wurde die FHR2::MAA Interaktion ebenfalls mittels ELISA untersucht. Es konnte jedoch auch bei der höchsten FHR2 Konzentration (10 µg/ml) keine Bindung an immobilisiertes MAA-BSA nachgewiesen werden (Abbildung 16 B).

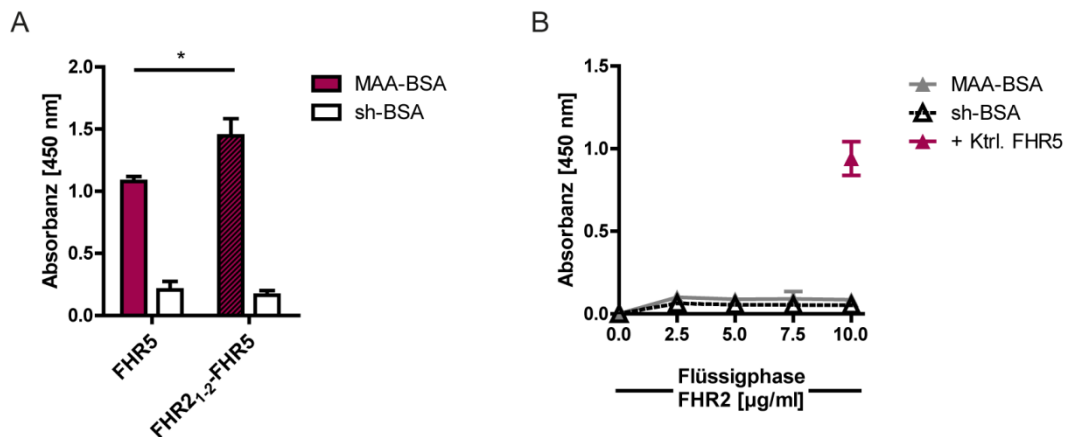


Abbildung 16: FHR2₁₋₂-FHR5 bindet FHR2-unabhängig stärker an MAA-BSA als FHR5. (A) Die Bindungsstärken von FHR2₁₋₂-FHR5 und FHR5 an MAA-BSA wurden mittels ELISA verglichen. MAA-BSA und sh-BSA wurden dafür zunächst immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurden FHR5 oder FHR2₁₋₂-FHR5 (5 µg/ml) in der Flüssigphase zugeben. Die gebundenen Proteine wurden unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. Das Hybridprotein FHR2₁₋₂-FHR5 hat dabei signifikant stärker an MAA-BSA gebunden als Wildtyp-FHR5. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Diese wurden von Julian Matthes (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) durchgeführt und im Rahmen seiner Bachelorarbeit veröffentlicht (139). **(B)** Die dosisabhängige Bindung von FHR2 (2,5-10 µg/ml) an MAA-BSA wurde mittels ELISA untersucht. Die Detektion der Bindung erfolgte unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers. FHR2 hat in keiner der getesteten Konzentrationen an MAA-BSA gebunden. Die Bindung von FHR5 (10 µg/ml) an MAA-BSA wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Bindung von FHR5 und FHR2₁₋₂-FHR5 an MAA-BSA wurde in den bisher gezeigten Experimenten unter Verwendung rekombinanter Proteine untersucht. Aufgrund dessen wurde mittels CEWA (kombinierte ELISA und Western Blot Analyse) getestet, ob auch Serum-FHR5 bzw. FHR2₁₋₂-FHR5 aus Patientenserum an MAA-BSA binden. Zu diesem Zweck wurde eine Mikrotiterplatte mit MAA-BSA und sh-BSA beschichtet und mit normalem humanen Serum (NHS) oder Patientenserum inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gebundenen Proteine von der Oberfläche eluiert und via Gelelektrophorese getrennt. Anschließend wurden FHR5 und das Hybridprotein mittels Western Blot detektiert. Sowohl das Wildtyp-Protein FHR5 (Abbildung 17, Spur 1 und Spur 3, jeweils untere

Bande) als auch das krankheitsassoziierte Protein FHR2₁₋₂-FHR5 (Abbildung 17 A, Spur 3, obere Bande) haben spezifisch an MAA-BSA gebunden.

Um die Bindung von Serum-FHR5 an MAA-BSA zu verifizieren, wurde zusätzlich ein ELISA Experiment durchgeführt. MAA-BSA und sh-BSA wurden immobilisiert und mit NHS oder FHR1/FHR3-defizientem Serum inkubiert. Die Bindung von FHR5 wurde durch ein spezifisches Antiserum nachgewiesen. FHR5 hat sowohl aus NHS als auch aus FHR1/FHR3-defizientem Serum an MAA-BSA gebunden (Abbildung 17 B).

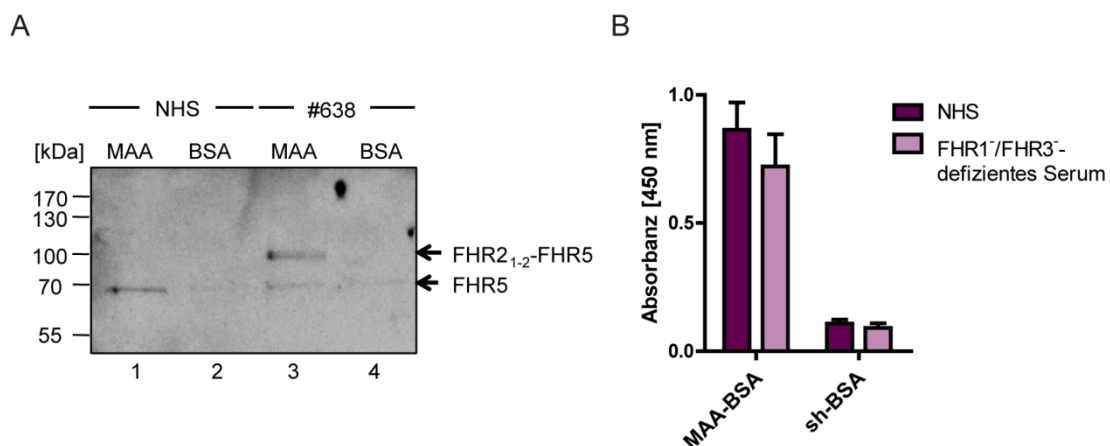


Abbildung 17: FHR5 und FHR2₁₋₂-FHR5 aus humanem Serum binden an MAA-BSA. (A) MAA-BSA und die Negativkontrolle sh-BSA wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde die MAA-BSA-beschichtete Oberfläche mit humanem Serum (20 % NHS oder Serum des C3G Patienten #638) inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine eluiert und mittels Gelelektrophorese separiert. FHR5 und FHR2₁₋₂-FHR5 wurden anschließend mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen FHR5 Antiserums detektiert. FHR5 (Spur 1 und Spur 3, untere Banden) und FHR2₁₋₂-FHR5 (Spur 3, obere Bande) aus Serum haben spezifisch an die MAA-BSA Oberfläche gebunden. Es ist ein repräsentativer Western Blot von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet. **(B)** Die Bindung von Serum-FHR5 an MAA-BSA wurde mittels ELISA verifiziert. Hierzu wurden MAA-BSA und sh-BSA immobilisiert und nach einem Blockierschritt mit humanem Serum (10 %) inkubiert. Gebundenes FHR5 wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. FHR5 hat sowohl aus NHS als auch aus FHR1/FHR3-defizientem Serum spezifisch an MAA-BSA gebunden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um zu demonstrieren, dass FHR5 tatsächlich über MAA-Epitope an modifizierte Zellen bindet, wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt. FHR5 wurde dafür zunächst in einem Reaktionsgefäß in der Flüssigphase mit MAA-BSA oder sh-BSA vorinkubiert. Anschließend wurden nekrotische HUVECs mit der Lösung resuspendiert und die Bindung von FHR5 an die Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oberflächenbindung von FHR5 durch die Vorinkubation mit MAA-BSA reduziert war, jedoch nicht signifikant (Abbildung 18).

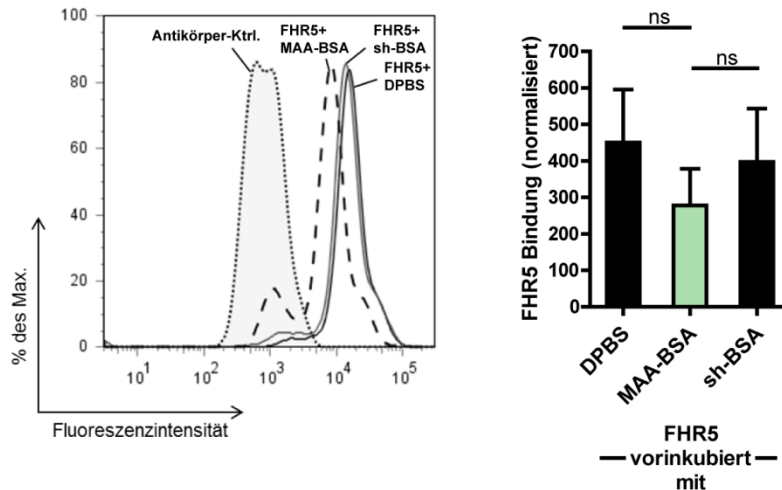


Abbildung 18: Die Vorinkubation mit MAA-BSA bewirkt eine Reduktion der FHR5 Bindung an nekrotische Zellen. Um die Interaktion von FHR5 und MAA-BSA in der Flüssigphase zu untersuchen, wurde rekombinantes FHR5 mit MAA-BSA (oder sh-BSA) in einem Reaktionsgefäß vorinkubiert (jeweils 20 µg/ml). Anschließend wurde die Lösung zu nekrotischen HUVECs gegeben und die Zellbindung von FHR5 unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers durchflusszytometrisch analysiert. Die Bindung von, mit MAA-BSA vorinkubiertem, FHR5 war im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Das Histogramm zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die MFI-Werte wurden basierend auf die Antikörperkontrolle normalisiert und im Balkendiagramm dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um dennoch zu verifizieren, dass FHR5 über MAA-Epitope an die Oberfläche veränderter Zellen bindet, wurde im Rahmen einer Kooperation ein zusätzliches Experiment durchgeführt (Dr. Nikolina Papac-Milicevic, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Binder, Medizinische Universität Wien). Hierfür wurden apoptotische Zellen zunächst immunodepletiert und in zwei Zellfraktionen separiert ($\text{MAA}^{\text{high}} \triangleq \text{IC-n}$ und $\text{MAA}^{\text{low}} \triangleq \text{LR04-n}$). Beide Fraktionen wurden mit rekombinantem FHR5 inkubiert und die Bindung anschließend unter Verwendung eines FHR5 Antiserums durchflusszytometrisch quantifiziert. FHR5 hat dabei mit signifikant geringerer Intensität an Zellen mit wenig MAA-Epitopen auf der Oberfläche (MAA^{low}) gebunden (siehe Anhang, Ergänzende Abbildung 1). Dies bedeutet, dass die Menge an MAA-Epitopen die Intensität der FHR5 Bindung an modifizierte Zelloberflächen beeinflusst.

4.2.5 FHR5 inhibiert die Kofaktoraktivität von Faktor H auf MAA-exponierenden Oberflächen durch Konkurrenzbindung

Neben FHR5 bindet auch der Komplementinhibitor Faktor H an MAA-Epitope (67). Deshalb wurde spekuliert, dass beide Regulatorproteine um die Bindung an den Interaktionspartner konkurrieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde rekombinantes FHR5 in aufsteigenden Konzentrationen mit aufgereinigtem Faktor H vermischt und

anschließend auf eine MAA-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Die Faktor H Bindung wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers M16 gemessen. FHR5 hat die Bindung von Faktor H an MAA-BSA dosisabhängig inhibiert (Abbildung 19 A). Die Gegenwart von BSA hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Bindung. Konsequenterweise hat die Zugabe von rekombinantem FHR5 zu hitzeinaktiviertem Serum ebenfalls zur Reduktion der Faktor H Bindung an MAA-BSA geführt, während FHR2 keinen Effekt hatte (Abbildung 19 B). Erstaunlicherweise war die Bindung von Faktor H an MAA-BSA in hitzeinaktiviertem Serum des C3G Patienten #638 (hiS#638) ohne Zugabe weiterer Proteine bereits signifikant geringer als in hitzeinaktiviertem Serum gesunder Donoren (hiNHS). FHR5 zeigte jedoch auch hier den inhibierenden Effekt auf die Faktor H::MAA-BSA Interaktion. Die Zugabe von FHR2 hatte wiederum keinen Einfluss auf die Bindung.

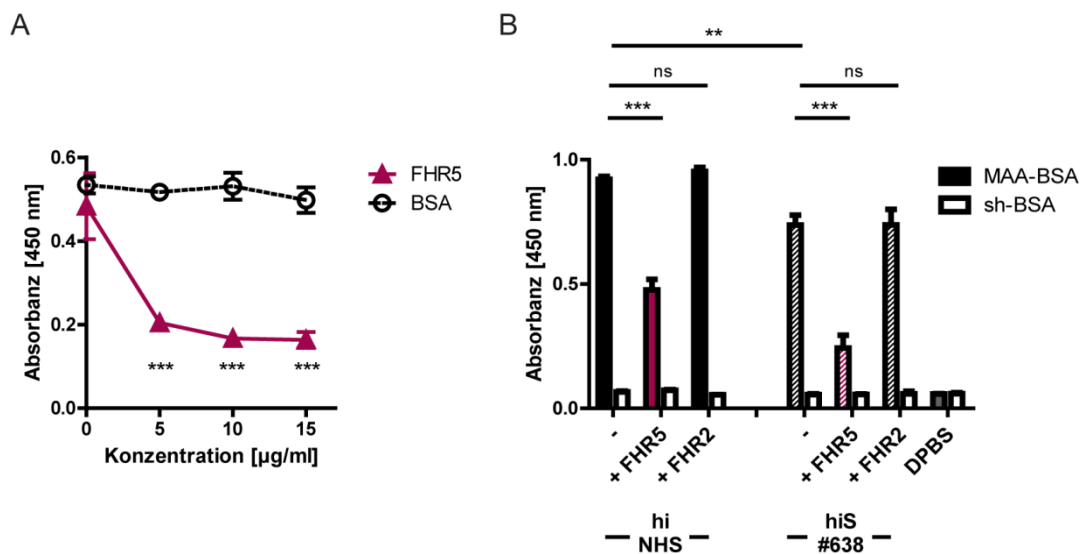


Abbildung 19: FHR5 konkurriert mit Faktor H um die Bindung an MAA-BSA. (A) MAA-BSA (10 µg/ml) wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und danach mit Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde Faktor H (250 nM) mit FHR5 oder BSA (aufsteigende Konzentrationen) vermischt und zu den MAA-beschichteten Kavitäten gegeben. Die Faktor H Bindung wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers M16 detektiert. FHR5 hat die Bindung von Faktor H an MAA-BSA dosisabhängig inhibiert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. **(B)** MAA-BSA und sh-BSA (10 µg/ml) wurden immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde hitzeinaktiviertes Serum (20 % hiNHS oder hiS des C3G Patienten #638) in An- oder Abwesenheit von rekombinantem FHR5 oder FHR2 (20 µg/ml) auf die beschichtete Platte gegeben. Nach der Inkubation wurde die Faktor H Bindung mittels des monoklonalen Antikörper M16 untersucht. Die Zugabe von FHR5 zum Serum hat die Faktor H Bindung an MAA-BSA verringert, während die Zugabe von FHR2 keinen Einfluss hatte. Die Bindung von Faktor H aus Patientenserum war, verglichen mit NHS, bereits ohne Zugabe weiterer Proteine signifikant geringer. Jedoch hat die Zugabe von FHR5 im Gegensatz zu FHR2 auch hier zur Inhibition der Faktor H Bindung geführt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

MAA-gebundener Faktor H besitzt Kofaktoraktivität für die Serinprotease Faktor I und ist damit an der Degradation des Opsonins C3b auf MAA-exponierenden Oberflächen beteiligt (67). Da FHR5 mit Faktor H um die MAA-Bindung konkurriert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Komplementaktivator die Faktor H-vermittelte C3b-Spaltung auf MAA-Oberflächen reduziert. Um dies zu überprüfen, wurde FHR5 zunächst an eine MAA-beschichtete Oberfläche gebunden und anschließend mit Faktor H inkubiert. Nach Zugabe von C3b und Faktor I wurden die Überstände abgenommen, via Gelelektrophorese separiert und die C3-Spaltprodukte mittels Western Blot detektiert. Die Gegenwart von FHR5 hat eine signifikante Reduktion der C3b-Degradation auf MAA-Oberflächen bewirkt (Abbildung 20 A, Spur 2 vs. Spur 3). FHR5 allein hatte keine Kofaktoraktivität (Abbildung 20 A, Spur 4). Die Bandenintensitäten der $\alpha'43/\alpha'41$ Fragmente wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Image J quantifiziert und statistisch ausgewertet (Abbildung 20 B). Auf einer mit sh-BSA beschichteten Kontrolloberfläche fand keine C3b-Spaltung statt (Abbildung 20 C).

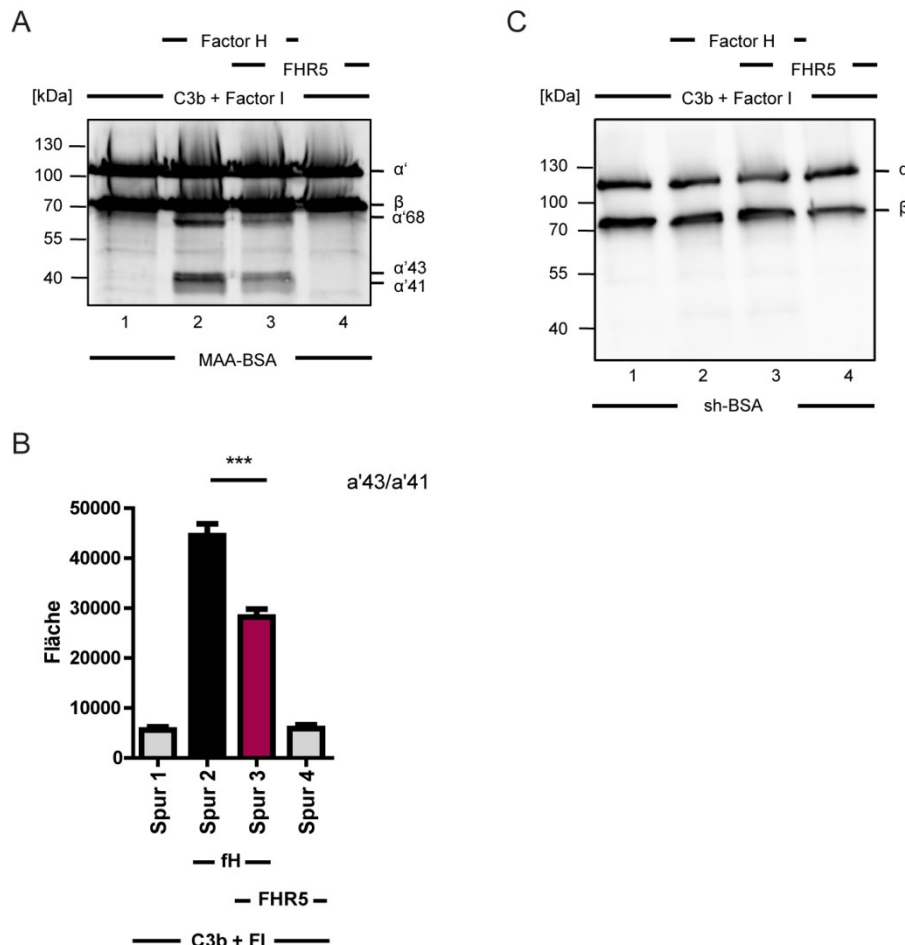


Abbildung 20: FHR5 reduziert die Kofaktoraktivität von Faktor H auf MAA-exponierenden Oberflächen. (A) MAA-BSA (10 $\mu\text{g/ml}$) wurde zunächst auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach einem Blockierschritt wurden FHR5 (320 nM) und/oder Faktor H (322 nM) in den oben abgebildeten Kombinationen zugegeben. Nach der Inkubation und intensivem Waschen wurde C3b (140 nM) gemeinsam mit Faktor I (220 nM) appliziert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und mittels SDS-PAGE separiert. Die C3b-Spaltprodukte wurden unter Verwendung eines C3 spezifischen Antiserums via Western Blot detektiert. Die C3b-Degradation war in Gegenwart von FHR5 (Spur 3 vs. Spur 2) verringert. FHR5 hat somit die Kofaktoraktivität von Faktor H auf der MAA-beschichteten Oberfläche inhibiert. FHR5 allein bewirkte keine C3b-Spaltung (Spur 4). Spur 1 zeigt die Kontrolle ohne FHR5 und/oder Faktor H. Es ist ein repräsentativer Western Blot von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet. (B) Die Intensitäten der $\alpha'_{43}/\alpha'_{41}$ Banden des in (A) dargestellten Western Blots wurden mit Hilfe der Software Image J quantifiziert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD. (C) Auf der Kontrolloberfläche sh-BSA wurde C3b nicht gespalten. Es ist ein repräsentativer Blot von zwei unabhängigen Experimenten abgebildet.

4.2.6 MAA-gebundenes FHR5 aktiviert das Komplementsystem

FHR5 bindet über MAA-Epitope an geschädigte Wirtszellen und konkurriert dabei mit dem Komplementinhibitor Faktor H. Um die Funktion von FHR5 auf der oxidationsspezifischen Oberfläche zu untersuchen, wurde zunächst NHS oder Serum des C3G Patienten #638 in Anwesenheit von komplementaktivem NHS auf eine MAA-beschichtete Oberfläche gegeben. Anschließend wurde die Komplementaktivierung über die C3-Fragmentdeposition gemessen. Die Zugabe von NHS allein bewirkte dabei bereits eine

verstärkte Ablagerung von C3-Spaltprodukten (Abbildung 21 A). Die Anwesenheit des Patientensерums, welches das stark MAA-bindende FHR2₁₋₂-FHR5 Hybridprotein enthält, steigerte die Deposition der C3-Fragmente auf der oxidationsspezifischen Oberfläche gegenüber NHS. Diese Ergebnisse deuten bereits auf die komplementaktivierende Wirkung von FHR5 auf MAA-Oberflächen hin. Um den Einfluss von FHR5 zu verifizieren, wurden FHR5, die MAA-bindende Deletionsmutante FHR5₅₋₇ oder BSA zunächst an eine MAA-beschichtete Oberfläche gebunden. Im Anschluss wurde aktives oder hitzeinaktiviertes NHS zugegeben und danach die C3-Fragmentablagerung quantifiziert. MAA-gebundenes FHR5 steigerte die C3-Fragmentdeposition, während die Mitteldomäne FHR5₅₋₇ allein keine Erhöhung der Komplementaktivität bewirkte (Abbildung 21 B). Nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Serum war dieser Effekt erwartungsgemäß nicht mehr detektierbar, da kein aktives Komplement mehr vorhanden ist. Auf der mit sh-BSA beschichteten Kontrolloberfläche wurde unter gleichen Bedingungen ebenfalls keine C3-Fragmentablagerung nachgewiesen (Abbildung 21 C).

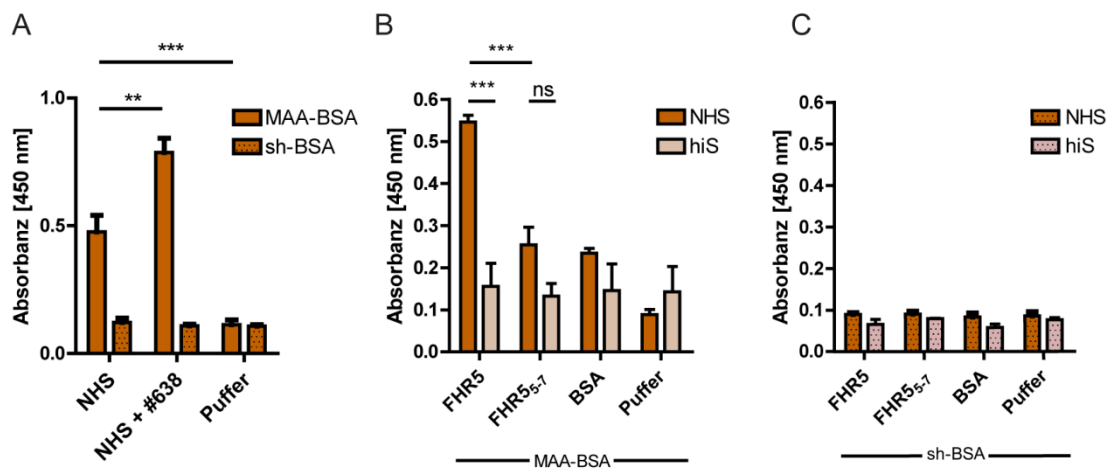


Abbildung 21: MAA-gebundenes FHR5 verstärkt die Deposition von C3-Aktivierungsfragmenten. (A) Eine Mikrotiterplatte wurde mit MAA-BSA oder sh-BSA (5 µg/ml) beschichtet und die unspezifischen Bindestellen blockiert. Danach wurden NHS (10 %) oder Serum des C3G Patienten #638 (5% Patientenserum kombiniert mit 5% komplementaktivem NHS) zugegeben. Danach wurden die abgelagerten C3-Aktivierungsfragmente unter Verwendung eines C3d Antiserums detektiert. Die C3-Fragmentablagerung war in Anwesenheit des Patientensерums erhöht. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ±SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) FHR5, FHR5₅₋₇ oder BSA (200 nM) wurden auf einer MAA-BSA beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Entfernen der ungebundenen Proteine wurden NHS oder hitzeinaktiviertes Serum (jeweils 2 %) zugegeben und die C3-Fragmentablagerung mit Hilfe des C3d spezifischen Antiserums detektiert. MAA-gebundenes FHR5 hat die C3-Fragmentdeposition gesteigert. Die MAA-bindende Deletionsmutante FHR5₅₋₇ allein hatte keinen Einfluss auf die Komplementaktivität. Bei Zugabe von hitzeinaktiviertem Serum war der Effekt von MAA-gebundenem FHR5 nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ±SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (C) Auf einer sh-BSA-beschichteten Oberfläche hatte FHR5 keinen Einfluss auf die C3-Fragmentablagerung. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ±SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Neben der Deposition von C3-Aktivierungsfragmenten wurde zur Verifizierung der komplementaktivierenden Wirkung auch die Freisetzung des Anaphylatoxins C3a auf MAA-Epitopen in Anwesenheit von FHR5 untersucht. Hierfür wurde MAA-BSA ebenfalls immobilisiert und mit Volllängen-FHR5, FHR5₅₋₇ oder BSA inkubiert. Nach Zugabe von aktivem bzw. hitzeinaktiviertem NHS wurden die C3a Spiegel im Überstand mit Hilfe eines kommerziellen ELISA-Kits gemessen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der C3-Fragmentdeposition hat MAA-gebundenes FHR5 in Gegenwart von aktivem NHS die Freisetzung von C3a bewirkt (Abbildung 22 A). Die Deletionsmutante FHR5₅₋₇ allein hatte keinen Einfluss auf die Bildung des Anaphylatoxins. Auf der Kontrolloberfläche sh-BSA wurde erwartungsgemäß kein C3a detektiert (Abbildung 22 B).

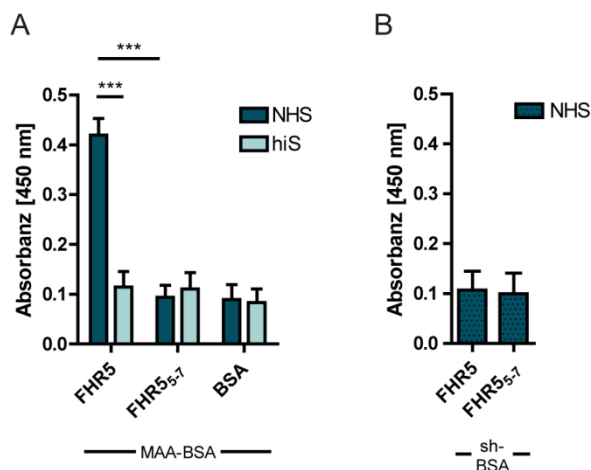


Abbildung 22: MAA-gebundenes FHR5 verstärkt die C3a Freisetzung. (A) FHR5, FHR5₅₋₇ oder BSA (200 nM) wurden auf eine MAA-BSA-beschichtete (5 µg/ml) Mikrotiterplatte gegeben. Nach intensivem Waschen wurden NHS oder hitzeinaktiviertes Serum (jeweils 2 %) zugegeben und die C3a Spiegel mit Hilfe eines kommerziellen Kits quantifiziert. FHR5 hat die Bildung von C3a auf der MAA-Oberfläche induziert, während die MAA-bindende Deletionsmutante FHR5₅₋₇ allein keinen Effekt auf die C3a Konzentration im Überstand hatte. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ±SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Auf der mit sh-BSA beschichteten Oberfläche konnte keine C3a Freisetzung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ±SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.3 FHR5 aktiviert das Komplementsystem auf Laminin-521

4.3.1 FHR5 bindet über die SCRs 5-7 an Laminin-521

FHR5 bindet über MAA-Epitope an modifizierte Wirtszellen. Dies liefert eine Erklärung für die FHR5 Ablagerung im Mesangium geschädigter Glomeruli bei C3G Patienten. FHR5 ist bei C3G Patienten jedoch ebenfalls entlang der GBM abgelagert. Da die Interaktionspartner dort bisher unbekannt sind, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob FHR5 an die EZM-Komponente Laminin-521 bindet.

In einem ELISA-basierten Experiment konnte gezeigt werden, dass das Volllängenprotein FHR5 an oberflächengebundenes Laminin-521 bindet (Abbildung 23 A). Hierfür wurde Laminin-521 immobilisiert und rekombinantes FHR5 hinzugegeben. Die Bindung wurde mit Hilfe des monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. FHR5 hat dabei spezifisch an Laminin-521 gebunden. Um die Interaktionsdomäne innerhalb des Proteins zu identifizieren, wurde im gleichen Versuchsaufbau die Bindung der Deletionsmutanten an immobilisiertes Laminin-521 untersucht. FHR5₅₋₇ hat an Laminin-521 gebunden, während für die Deletionsmutanten FHR5₁₋₂, FHR5₃₋₄ und FHR5₈₋₉ keine Bindung detektiert wurde (Abbildung 23 B).

Um bei der Interaktion strukturelle Einflüsse der Deletionsmutanten auszuschließen, wurde ein Konkurrenz-Assay durchgeführt, bei dem die Bindung von biotinyliertem Volllängen-FHR5 an Laminin-521 über die Streptavidin-Interaktion in Gegenwart von FHR5₅₋₇ oder FHR5₁₋₂ gemessen wurde. FHR5₅₋₇ hat die FHR5 Bindung an Laminin-521, im Gegensatz zu FHR5₁₋₂, dosisabhängig inhibiert (Abbildung 23 C). Die Struktur der Deletionsmutante hat somit keinen Einfluss auf die Interaktion.

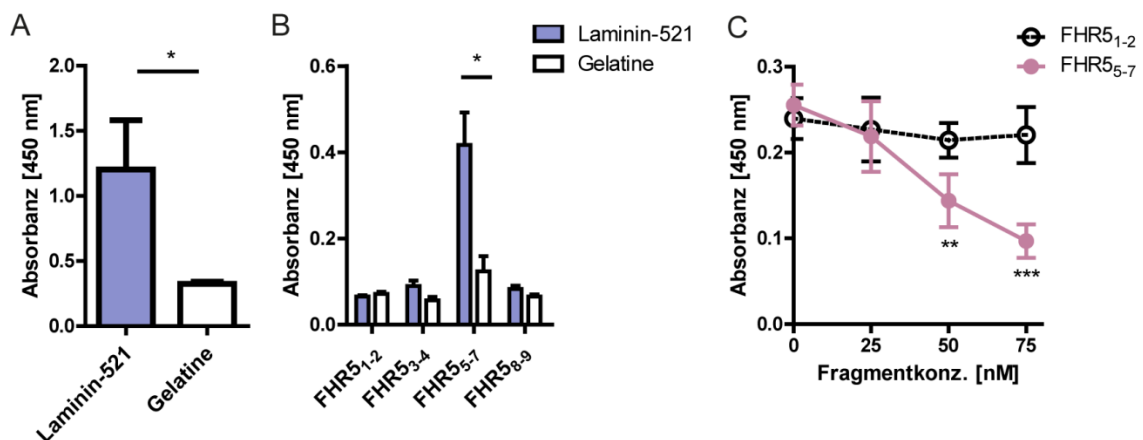


Abbildung 23: FHR5 bindet über die Mittelregion an Laminin-521. (A) Laminin-521 und Gelatine (10 µg/ml) wurden immobilisiert. Nach Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde FHR5 (50 nM) in die jeweiligen Kavitäten gegeben und die Bindung unter Verwendung des monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. Das Volllängenprotein FHR5 hat spezifisch an Laminin-521 gebunden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Deletionsmutanten FHR5₅₋₇, FHR5₁₋₂, FHR5₃₋₄ und FHR5₈₋₉ (50 nM) wurden ebenfalls auf eine Laminin-521-beschichtete (10 µg/ml) Mikrotiterplatte gegeben und die Bindung mittels des monoklonalen c-myc Antikörpers detektiert. FHR5₅₋₇ hat als einzige Deletionsmutante an Laminin-521 gebunden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (C) Nach Immobilisierung von Laminin-521 (10 µg/ml) wurden zunächst die unspezifischen Bindestellen blockiert. Anschließend wurden die Deletionsmutanten FHR5₁₋₂ oder FHR5₅₋₇ in aufsteigenden Konzentrationen (25-75 nM) mit biotinyliertem Volllängen-FHR5 (75 nM) vermischt und auf die beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Gebundenes FHR5 wurde mittels Streptavidin detektiert. FHR5₅₋₇ hat die Bindung von FHR5 an Laminin-521 dosisabhängig inhibiert. Die Zugabe von FHR5₁₋₂ hatte keinen Einfluss auf die Bindung. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.3.2 FHR5 und Laminin kolokalisieren entlang der glomerulären Basalmembran

Um zu bestätigen, dass die FHR5::Laminin Interaktion auch *in vivo* stattfindet, wurden beide Moleküle in einer Biopsie eines nierenerkrankten Patienten (Lupus Nephritis) mittels *Proximity Ligation Assay* auf Kolokalisation untersucht (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thorsten Wiech, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). FHR5 kolokalisierte innerhalb der peripheren GBM mit den Lamininketten $\alpha 5$, $\beta 2$ und $\gamma 2$, was durch die rote Färbung visualisiert wurde (Abbildung 24, Bilder I-III). In einer ebenfalls untersuchten Kontrollbiopsie (Transplantat) konnte keine Kolokalisation detektiert werden (Abbildung 24, Bilder IV-VI).

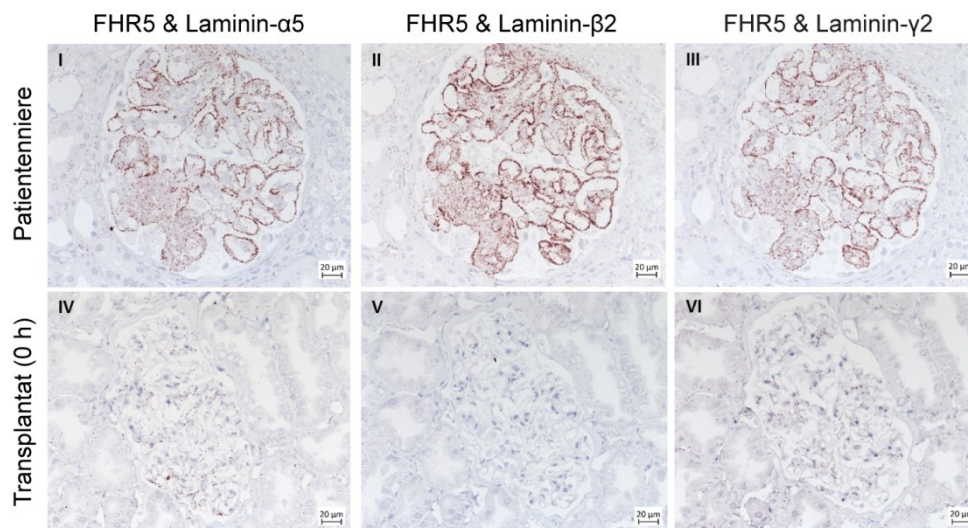


Abbildung 24: FHR5 und Laminin kolokalisieren entlang der glomerulären Basalmembran. Ein *Proximity Ligation Assay* in einer Nierenbiopsie eines Lupus Nephritis Patienten (Klasse IV) zeigt, dass FHR5 mit Laminin- $\alpha 5$, Laminin- $\beta 2$ und Laminin- $\gamma 2$ entlang der peripheren glomerulären Basalmembran kolokalisierte (rote Färbung). In der Biopsie eines Transplantats wurde hingegen keine Kolokalisation nachgewiesen. Die Färbungen wurden im Rahmen einer Kooperation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Wiech (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt sowie ausgewertet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.3.3 Laminin-521-gebundenes FHR5 aktiviert das Komplementsystem

Zur Prüfung der komplementaktivierenden Wirkung von Laminin-gebundenem FHR5 wurden das FHR5, Faktor H, FHR2 oder BSA auf einer Laminin-521-beschichteten Oberfläche inkubiert. Nach Zugabe von aktivem NHS wurde die Komplementaktivierung über die C3-Fragmentablagerung quantifiziert. Während Laminin-gebundenes FHR5 die C3-Fragmentdeposition erhöhte, hatten Faktor H und FHR2 keinen Einfluss auf die

Komplementaktivität (Abbildung 25 A). In Gegenwart von komplementinaktivem Serum (hitzeinaktiviert) hatte FHR5 erwartungsgemäß keinen Effekt (Abbildung 25 B).

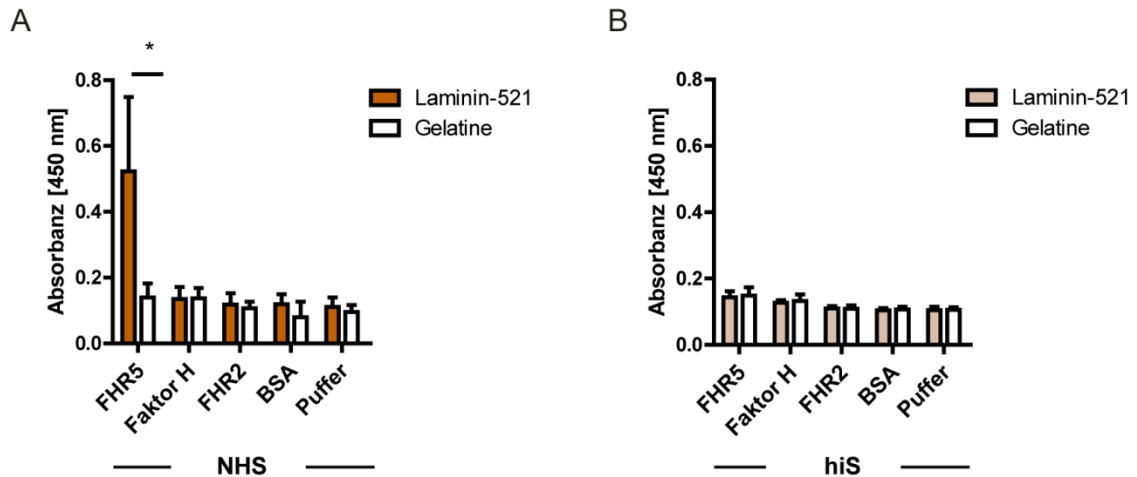


Abbildung 25: Laminin-gebundenes FHR5 verstärkt die C3-Fragmentdeposition. (A) Eine Mikrotiterplatte wurde zunächst mit Laminin-521 oder Gelatine (10 µg/ml) beschichtet. Anschließend wurden FHR5, Faktor H, FHR2 oder BSA (200 nM) in den beschichteten Kavitäten inkubiert. Nach Entfernen der ungebundenen Proteine wurde NHS (10 %) zugegeben und die C3-Fragmentablagerung mittels eines C3d spezifischen Antiserums detektiert. Laminin-gebundenes FHR5 hat die C3-Fragmentdeposition in Gegenwart von NHS verstärkt. Die Kontrollproteine Faktor H und FHR2 zeigten keinen Effekt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Nach Zugabe von hitzeinaktiviertem Serum war der Effekt von Laminin-gebundenem FHR5 nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Oberflächengebundenes FHR5 stimuliert die TNF α und hemmt die IL-10 Sekretion von humanen Monozyten

Da sowohl MAA- als auch Laminin-gebundenes FHR5 die Komplementkaskade aktivieren und eine Aktivierung des Systems zur Rekrutierung von Immunzellen führen kann (141-143), wurde untersucht, ob oberflächengebundenes FHR5 humane Monozyten beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde FHR5 auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit frisch isolierten Monozyten in Gegenwart von NHS und An- oder Abwesenheit von Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die TNF α bzw. IL-10 Konzentrationen im Überstand quantifiziert. Oberflächengebundenes FHR5 hat die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF α in Abwesenheit von LPS induziert, während die mitgeführten Kontrollproteine Faktor H und BSA keinen Einfluss auf die Zytokinkonzentration hatten (Abbildung 26 A). In Gegenwart von LPS, welches die Freisetzung von TNF α per se induziert (144, 145), hat FHR5 die Sekretion von TNF α im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt (Abbildung 26 B).

Im Gegensatz dazu wurde ohne Zusatz von LPS kein IL-10 in den Überständen detektiert (Abbildung 26 C). Wurde die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins durch Zugabe von LPS induziert (144), hat FHR5 eine signifikante Reduktion der IL-10 Konzentration bewirkt (Abbildung 26 D). Oberflächengebundenes FHR5 hat somit eine proinflammatorische Wirkung auf humane Monozyten.

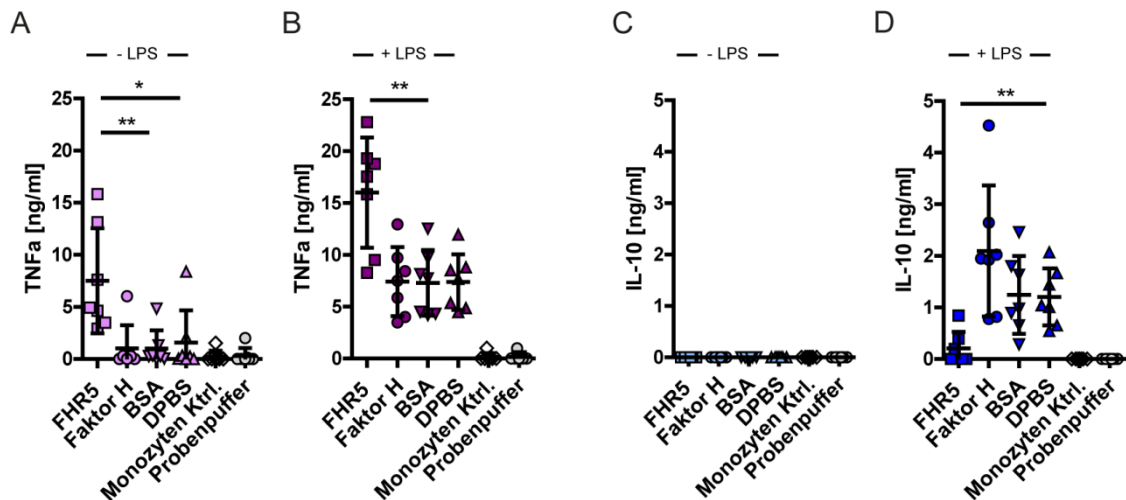


Abbildung 26: Oberflächengebundenes FHR5 wirkt proinflammatorisch auf humane Monozyten. (A-D) Isolierte Monozyten wurden zusammen mit 10 % NHS in Ab- oder Anwesenheit von LPS (5 ng/ml) auf einer, mit den abgebildeten Proteinen (5 µg/ml) beschichteten Mikrotiterplatte, inkubiert. Nach zwanzigstündiger Inkubation wurden die TNFα bzw. IL-10 Konzentrationen in den Überständen bestimmt. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert \pm SD. (A) Immobilisiertes FHR5 hat die Sekretion von TNFα in Abwesenheit von LPS signifikant gesteigert. Die Kontrollproteine Faktor H und BSA hatten keinen Einfluss auf die TNFα Bildung. (B) LPS hat die Freisetzung von TNFα in allen Ansätzen induziert. Oberflächengebundenes FHR5 hat die TNFα Sekretion im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt. (C) Ohne Zugabe von LPS wurde in keiner Probe IL-10 detektiert. (D) Die Gegenwart von LPS führte zur Induktion der IL-10 Sekretion in den Kontrollen. Immobilisiertes FHR5 hat die IL-10 Bildung inhibiert.

Da FHR5 an veränderte und geschädigte körpereigene Strukturen bindet, das Komplementsystem dort aktiviert und selbst als Plattform zur C3b Rekrutierung dient, wurde spekuliert, dass das Protein die Phagozytose von modifiziertem Materials begünstigt. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden apoptotische HUVECs (DiD-gefärbt) mit BSA, FHR5 oder Properdin vorinkubiert und anschließend mit frisch isolierten Monozyten von gesunden Donoren (DiO-gefärbt) in Anwesenheit von NHS koinkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse und Quantifizierung der doppelt positiven Zellen. Die Abbildung zeigt, dass die Vorinkubation der apoptotischen Zellen mit FHR5 (40,18 %), im Vergleich zu BSA (36 %), zu einem leichten Anstieg der Phagozytoserate geführt hat (Abbildung 27, *Panel 2* vs. *Panel 1*). Properdin wurde als Positivkontrolle mitgeführt (Abbildung 27, *Panel 3*)

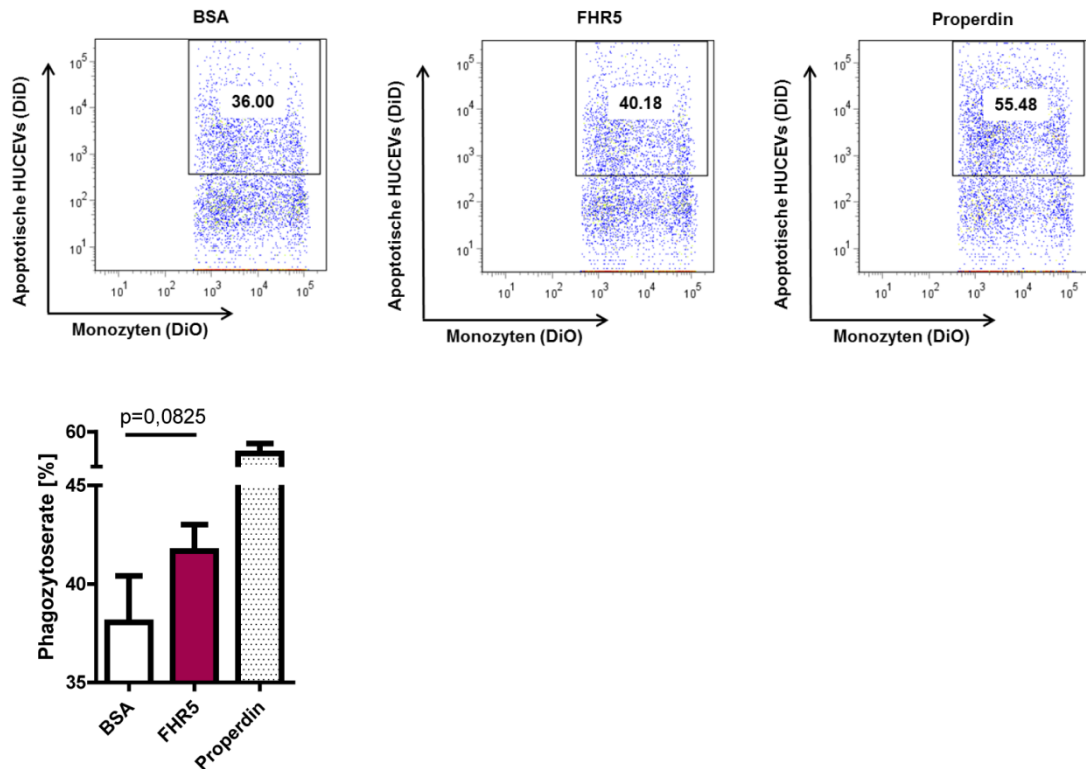


Abbildung 27: FHR5 unterstützt die Phagozytose modifizierter Zellen. DiD-gefärbte apoptotische HUVECs wurden mit BSA, FHR5 oder Properdin vorinkubiert und anschließend mit frisch isolierten DiO-gefärbten Monozyten in Gegenwart von NHS (10 %) koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die Rate an doppelt positiven Zellen ermittelt. Die Vorinkubation mit FHR5 hat die Phagozytoserate (gegenüber BSA) tendenziell gesteigert. Properdin diente in diesem Versuch als Positivkontrolle. Es ist eine repräsentative Abbildung von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet bzw. repräsentieren die Ergebnisse den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.5 FHR5 verstärkt die Schädigung humaner Mesangialzellen

FHR5 ist ausschließlich in Glomeruli von erkrankten Personen abgelagert. Um zu testen, ob FHR5 die Schädigung von Nierenzellen induziert, wurden adhärenz primäre Mesangialzellen für 24 Stunden in Gegenwart von rekombinantem FHR5 kultiviert. Die anschließende Untersuchung der Zellvitalität mittels *CellTiter-Blue*[®]-Assay ergab, dass FHR5 allein in keiner der getesteten Konzentrationen (3-20 μ g/ml) einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte (Abbildung 28 A). Im Gegensatz dazu hat die Gegenwart von NHS im Kulturmedium zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität geführt. Die Zugabe von FHR5 hat diesen Effekt verstärkt (Abbildung 28 B). FHR5 hat somit keinen schädigenden Einfluss auf intakte renale Zellen, sondern Verstärkt bestehende Schäden.

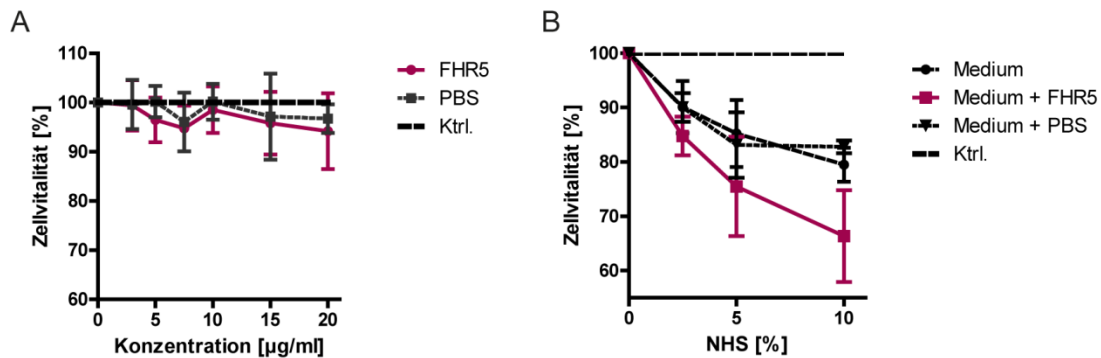


Abbildung 28: FHR5 verstärkt die NHS-induzierte Schädigung von Mesangialzellen. (A) FHR5 wurde zunächst ohne NHS in aufsteigenden Konzentrationen (3-20 µg/ml) zum Kulturmedium von adhärennten primären Mesangialzellen gegeben und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellschädigung mittels *CellTiter-Blue®*-Assay quantifiziert. FHR5 allein hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Die gestrichelte Linie (100 %) zeigt die unbehandelten Kontrollen (nur Medium), die als Referenz für die Zellvitalität dienten. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Wurde das Kulturmedium mit NHS (2,5-10 %) versetzt, hatte dies die dosisabhängige Reduktion der Zellvitalität zur Folge. Die Zugabe von FHR5 (10 µg/ml) hat zur Verstärkung der Zellschädigung geführt. Die gestrichelte Linie (100 %) zeigt die unbehandelten Kontrollen (Medium ohne NHS), die als Referenz für die Zellvitalität dienten. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da die Art der Zellschädigung im oben gezeigten Experiment nicht näher untersucht werden konnte, wurde anschließend überprüft, ob die Exposition von MAA-Epitopen auf der Oberfläche von Mesangialzellen durch Zugabe von NHS induziert wird. Zu diesem Zweck wurden die adhärennten Zellen zunächst erneut für 24 Stunden mit NHS-enthaltendem (2,5-10 %) Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die MAA-Epitope auf der Zelloberfläche unter Verwendung des monoklonalen IgM-Antikörpers E014 durchflusszytometrisch detektiert. Zur Unterscheidung intakter und toter Zellen wurde der Farbstoff Viablitii Dye780 verwendet. Hier konnte zunächst gezeigt werden, dass die Menge an toten Zellen mit der NHS-Konzentration im Medium korreliert (Abbildung 29 A). Dies bestätigt, dass die Gegenwart von NHS die Schädigung von adhärennten Mesangialzellen verursacht. Weiterhin stieg die Menge an exponierten MAA-Epitopen auf der Zelloberfläche konzentrationsabhängig an (Abbildung 29 B).

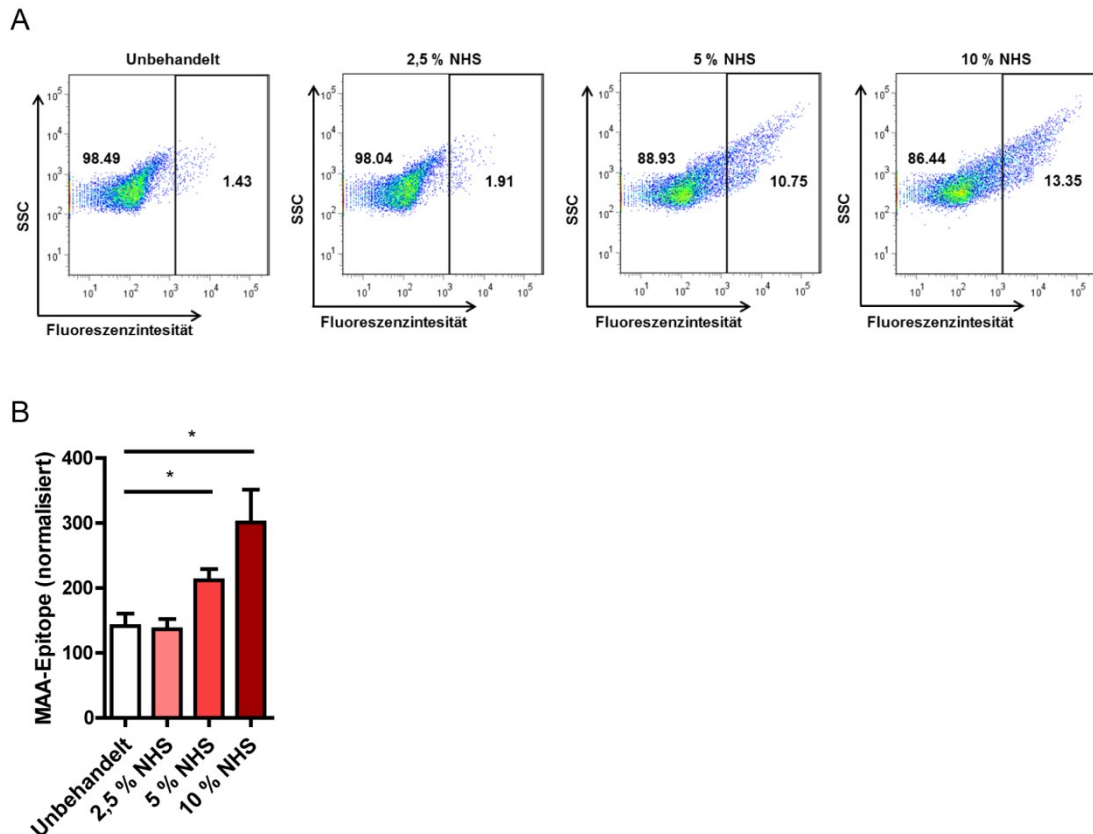


Abbildung 29: NHS schädigt humane Mesangialzellen und induziert die Exposition von MAA-Epitopen. (A, B) Adhärenz primäre humane Mesangialzellen wurden für 24 h mit NHS (2,5-10 % im Medium) inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und unter Verwendung des monoklonalen IgM-Antikörpers E014 durchflusszytometrisch analysiert. Der Farbstoff Viabiltiy Dye780 wurde zur Unterscheidung von intakten und toten Zellen eingesetzt. Es ist eine repräsentative Abbildung von mindestens drei unabhängigen Experimenten abgebildet. **(A)** Die Anzahl der toten Mesangialzellen hat sich mit steigender NHS-Konzentration im Kulturmedium erhöht. **(B)** Die Menge der exponierten MAA-Epitope auf der Zelloberfläche stieg bei der Behandlung mit 5% bzw. 10% NHS signifikant an. Die MFI-Werte wurden basierend auf die jeweilige spezifische Antikörperkontrolle normalisiert und im Balkendiagramm dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

Das Komplementsystem ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Die selbstamplifizierende Kaskade muss jedoch präzise reguliert werden, um eine ungerichtete Aktivierung auf gesundem Körpergewebe zu verhindern (13). So können infektiöse Erreger und verändertes körpereigenes Material effizient eliminiert werden, während intaktes Gewebe geschützt wird. Ein wichtiges Regulatorprotein des Systems ist der Komplementaktivator FHR5, der Teil der Faktor H/FHR Proteinfamilie ist (54).

FHR5 Hybridproteine sind bei der komplementvermittelten Nierenerkrankung C3-Glomerulopathie (C3G) bereits beschrieben (80, 92, 94, 146). Es ist jedoch bisher nicht verstanden, welche Rolle das Wildtyp-Protein FHR5 bei der Pathogenese der Erkrankung spielt und auch die physiologische Funktion von FHR5 ist bisher nur teilweise erforscht. In diesem Projekt wurde daher untersucht, wie FHR5 einerseits als physiologisches Protein in der Immunhomöostase gesunder Menschen agiert und unter welchen Bedingungen FHR5 andererseits zur Pathogenese von C3G beiträgt. Die Ergebnisse sollen die Therapiemöglichkeiten der Erkrankung positiv beeinflussen, da die Entwicklung eines geeigneten Komplementinhibitors durch ein tieferes Verständnis der Wirkungsweise von FHR5 unterstützt werden kann.

5.1 MAA-Epitope und Laminin tragen zur FHR5 Deposition in Glomeruli von C3G Patienten bei

5.1.1 FHR5 ist in die Pathogenese von C3G involviert

FHR5 wurde im Jahr 2001 als Mitglied der Faktor H/FHR Proteinfamilie identifiziert (91). Aufgrund der Detektion des Proteins in komplementhaltigen, glomerulären Ablagerungen, insbesondere bei Patienten mit IgA-Nephropathie sowie Membranöser Nephropathie, wurde postuliert, dass FHR5 eine Rolle bei der Pathogenese von glomerulären Erkrankungen spielt und komplementmodulierende Funktionen besitzt (90, 91). Bis dato war jedoch unbekannt, unter welchen Bedingungen FHR5 in geschädigten Glomeruli abgelagert wird und an welche Strukturen das Protein dort bindet. Aufgrund dessen wurde FHR5 im Rahmen einer Kooperation zunächst in Nierenbiopsien einer C3G Patientenkohorte lokalisiert (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thorsten Wiech, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). FHR5 war dabei vorwiegend im mesangialen Bereich des Glomerulus, im subendothelialen Raum sowie entlang der glomerulären Basalmembran abgelagert. Das Muster der FHR5 Ablagerungen deckte sich dabei mit den zuvor identifizierten elektronendichten Ablagerungen in geschädigten Glomeruli. Interessanterweise

haben die untersuchten Patienten, soweit bekannt, keine Mutationen im *CFHR5* Gen und exprimieren demnach keine FHR5 Hybridproteine. Die Bindung von Wildtyp-FHR5 an glomeruläre Strukturen und die damit verbunden Ablagerung des Proteins in den geschädigten Nieren kann also, unabhängig der Expression von Hybridproteinen, eine Rolle bei der Pathogenese von C3G spielen.

Da FHR5 in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert ist, stellte sich die Frage, ob die Proteinkonzentration im Serum der Patienten ebenfalls erhöht ist. Die Analyse der FHR5 Serumspiegel ergab, dass die untersuchten C3G Patienten mit durchschnittlich 3,95 µg/ml höhere FHR5 Level aufwiesen als die Kontrollgruppe mit durchschnittlich 3,01 µg/ml. Auffallend an diesen Ergebnissen ist, dass ein Drittel der getesteten Patienten dennoch niedrige FHR5 Konzentrationen (ca. 2 µg/ml) im Serum besaß. Diese Patienten sollten näher charakterisiert und weitere Parameter in die Untersuchung eingeschlossen werden, um festzustellen, ob die FHR5 Spiegel mit dem Grad der Erkrankung beziehungsweise mit dem Krankheitsverlauf korrelieren. Ein Zusammenhang wurde diesbezüglich bereits bei der Nierenerkrankung IgA-Nephropathie beschrieben. So konnte eine Studie aus dem Jahr 2017 demonstrieren, dass die FHR5 Serumlevel bei IgA-Nephropathie Patienten geringfügig erhöht sind. Es konnten bei dieser Untersuchung zwar keine Unterschiede hinsichtlich der FHR5 Konzentrationen zwischen Patienten mit stabiler und progressiver Form von IgA-Nephropathie nachgewiesen werden, allerdings waren höhere Serumlevel negativ mit dem Ansprechen auf eine immunsuppressive Behandlung korreliert. Des Weiteren korrelierten die FHR5 Serumkonzentrationen der Patienten mit histologischen Markern, welche repräsentativ für die renale Schädigung sind (147). Durch die Analyse der FHR5 Serumlevel bei C3G könnten ebenfalls Zusammenhänge mit der Schwere der Erkrankung oder dem Ansprechen auf potentielle Therapiemaßnahmen gezeigt werden. Es ist also durchaus sinnvoll, die Bestimmung der FHR5 Serumspiegel zukünftig in einer größeren Kohorte und unter Einbezug von histologischen Parametern durchzuführen. Ferner sollten die FHR Level im Serum auch unter dem Gesichtspunkt der eventuell möglichen Dimerbildung und Assoziation mit Lipoproteinen betrachtet werden (79, 81, 148). FHR5 bildet nachweislich Homodimere aus; ob jedoch auch die Heterodimerbildung mit FHR1 (Serumkonzentration: 122 µg/ml) und FHR2 (Serumkonzentration: 50 µg/ml) *in vivo* stattfindet, ist gegenwärtig nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (54, 72, 81, 132, 149). Es werden derzeit weitere Untersuchungen hinsichtlich der Dimerbildung von FHR Proteinen durchgeführt, sodass zukünftig präzisere Aussage darüber getroffen werden können, wie und in welchen Verhältnissen die jeweiligen Proteine im Serum vorliegen und ob eine Veränderung zum Krankheitsverlauf bei C3G beiträgt. Durch die Komplexbildung mit Lipoproteinen kann weiterhin nur ein Teil des tatsächlich vorhandenen FHR5 nachgewiesen werden. Hier ist

natürlich relevant, ob zusätzlich Unterschiede hinsichtlich des Lipoprotein-assoziierten FHR5 zwischen C3G Patienten und gesunden Personen existieren.

5.1.2 Die Rolle von MAA-Epitopen bei der FHR5 Deposition

FHR5 wird in geschädigten Glomeruli abgelagert. Jedoch ist bisher nicht beschrieben, wie und unter welchen Bedingungen die Ablagerung des Proteins stattfindet. Vorarbeiten zeigen, dass FHR5 nicht an intakte, sondern vorzugsweise an apoptotische und nekrotische Oberflächen bindet. Anschließend rekrutiert oberflächengebundenes FHR5 die Proteine Properdin und C3b und aktiviert das Komplementsystem auf diese Weise (77). In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass FHR5 an spezifischen Bereichen modifizierter Zellen akkumuliert. Diese Bereiche besitzen eine veränderte bzw. unterbrochene Membranstruktur und wurden von Lauer *et al.* als sogenannte *Urgent Regulation of Damage (URD) sites* beschrieben (150). Membranstrukturveränderungen werden häufig durch Oxidationsprozesse begünstigt. So werden beispielsweise MAA-Epitope vorwiegend in Folge der Oxidation von Membranphospholipiden gebildet (140). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass FHR5 über exponierte MAA-Epitope an *URD sites* bindet. Tatsächlich konnte durch konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie gezeigt werden, dass MAA-Epitope insbesondere an den von FHR5 präferierten *URD sites* modifizierter Zellen lokalisiert sind. Des Weiteren wurde zusätzlich durchflusszytometrisch demonstriert, dass intakte Zellen lediglich eine geringe Menge an MAA-Epitopen auf ihrer Oberfläche exponieren, während die Menge auf nekrotischen Zellen signifikant ansteigt. Diese Daten gaben bereits Hinweise darauf, warum FHR5 vorzugsweise an veränderte Zellen bindet (77). Die Untersuchung wurde sowohl mit einer immortalisierten Endothelzelllinie (HUVEC) als auch mit primären humanen Mesangialzellen durchgeführt. Die Verwendung der primären Mesangialzellen unterstreicht die physiologische Relevanz und zeigt, dass MAA-Epitope durch Schädigung im Mesangium exponiert werden könnten.

Die Kolo-kalisation von FHR5 und MAA-Epitopen an *URD sites* veränderter Zellen lies auf deren direkte Interaktion schlussfolgern. Zudem konnte in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden, dass rekombinantes FHR5 über die SCRs 5-7 an ein *in vitro* erzeugtes MAA-Addukt (MAA-BSA) bindet (82, 83). Um die Interaktion von FHR5 und oxidationsspezifischen MAA-Epitopen genauer zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit zunächst die Bindungsaffinität von FHR5 und MAA-BSA mittels *Biolayer Interferometry* untersucht. Die Dissoziationskonstante betrug 20,47 nM. FHR5 interagiert also mit nanomolarer Affinität mit MAA-Epitopen. Ferner konnte gezeigt werden, dass FHR5 dosisabhängig an MAA-Oberflächen bindet. Einerseits war die Bindung an die MAA-

Oberfläche verstärkt, je mehr FHR5 (2,5-10 µg/ml) in der Flüssigphase verfügbar war. Hier könnte ein Zusammenhang mit den erhöhten FHR5 Serumspiegeln bei C3G Patienten bestehen. Andererseits stieg die Bindung mit der verfügbaren Menge der exponierten MAA-Epitope an. Dies liefert eine Erklärung für die schwache Bindung von FHR5 an intakte Zellen (77), da diese nur eine geringe Menge an MAA-Epitopen auf ihrer Oberfläche exponieren. Aufgrund der physiologischen Relevanz wurde des Weiteren mit zwei unabhängigen Methoden bestätigt, dass neben rekombinantem FHR5 auch FHR5 aus humanem Serum an MAA-exponierende Oberflächen bindet. Die Bindung von FHR Proteinen an MAA-Epitope wurde bereits im Jahr 2011 in Erwägung gezogen. Beim experimentellen Nachweis der Bindung von Faktor H aus Serum an MAA-gekoppelte Polylysins-Beads konnten zusätzliche Banden im Western Blot visualisiert werden. Dabei handelte es sich höchstwahrscheinlich um, ebenfalls im Serum zirkulierende, FHR Proteine (67).

Um die Hypothese zu verifizieren, dass FHR5 tatsächlich über MAA-Epitope an modifizierte Zellen bindet, wurde zunächst durchflusszytometrisch untersucht, ob die Vorinkubation mit *in vitro* generiertem MAA-BSA einen Einfluss auf die FHR5 Bindung an nekrotische Zellen hat. Die Vorinkubation von FHR5 und MAA-BSA resultierte in einer leichten Reduktion der FHR5 Bindung. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die Interaktion der Komponenten in der Flüssigphase stattfand. Da MAA-Epitope unter physiologischen Bedingungen durch Oxidation von Membranphospholipiden generiert werden, sind diese normalerweise oberflächengebunden lokalisiert (96, 140). Strukturelle Einflüsse könnten die Interaktion von FHR5 und MAA-BSA in der Flüssigphase demnach reduzieren. Durch ein weiteres Experiment wurde im Rahmen einer Kooperation schließlich dennoch bestätigt, dass FHR5 vorwiegend über MAA-Epitope an modifizierte Zellen bindet. Wurden apoptotische Zellen in zwei Fraktionen aufgeteilt, bei der die eine Fraktion eine hohe Menge an MAA-Epitopen exponierte und die andere Fraktion eine geringe Menge, hat FHR5 verstärkt an die Zellen mit viel MAA-Epitopen auf der Oberfläche gebunden (Dr. Nikolina Papac-Milicevic, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Binder, Medizinische Universität Wien). Die Menge an MAA-Epitopen beeinflusst somit die Intensität der FHR5 Bindung an modifizierte Zellen.

Neben Wildtyp-FHR5 bindet auch das komplementüberaktivierende Hybridprotein FHR2₁₋₂-FHR5 (80) an MAA-exponierende Oberflächen. Die Bindung des Hybridproteins war dabei sogar signifikant stärker als die des Wildtyp-Proteins. Um auszuschließen, dass die stärkere Bindung auf die eventuell mit MAA-Epitopen interagierenden N-terminalen SCRs 1-2 von FHR2 zurückzuführen ist, wurde die Bindung von FHR2 an MAA-Oberflächen ebenfalls getestet. Es konnte jedoch keine Bindung von FHR2

nachgewiesen werden. Die verstärkte Interaktion des FHR2₁₋₂-FHR5 Hybridprotein mit MAA-exponierenden Oberflächen ist somit vermutlich mit der Fähigkeit zur Multimer-Bildung zu begründen (77). Dass die veränderte Bindung eines mutierten Regulatorproteins an oxidationsspezifische Epitope die Pathogenese einer komplementassoziierten Erkrankung begünstigen kann, wurde bereits beschrieben (67). Neben der Niere ist häufig das Auge von komplementvermittelten Krankheiten betroffen. So ist insbesondere die Netzhauterkrankung Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) mit Komplementdefekten assoziiert (151). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) im *Faktor H* Gen (Austausch der Aminosäure 402 Y→H) in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese von AMD steht. So bindet die mutierte Variante Faktor H_{H402} schwächer an MAA-exponierende Oberflächen als Wildtyp-Faktor H. Dies führt dazu, dass der proinflammatorische Effekt des MAA-exponierenden Materials durch die komplementinhibierende Wirkung von Faktor H nicht mehr ausreichend limitiert wird und Entzündungsprozesse begünstigt werden (67). Der beschriebene Mechanismus konnte somit eine konkrete Erklärung für die Beobachtung liefern, dass Träger des SNPs ein höheres Risiko für die Entstehung von AMD besitzen (152). Bezogen auf die komplementvermittelte Nierenerkrankung C3G und die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse kann postuliert werden, dass mutierte Varianten von FHR5 ebenfalls mit veränderter Intensität, in diesem Fall stärker, an MAA-exponierende Oberflächen binden und das Komplementsystem übermäßig aktivieren. Durch Untersuchung der Interaktion anderer FHR5 Hybridproteine, beispielsweise FHR5₁₋₂-FHR2 (93, 94) oder FHR5₁₋₂-FHR5 (92), mit MAA-Epitopen, könnte geklärt werden, ob es sich um einen generellen Mechanismus handelt. MAA-Epitope könnten sich dann insbesondere bei C3G Patienten mit FHR5 Hybridproteinen als Target für Therapiemaßnahmen erweisen.

Da sowohl der Komplementaktivator FHR5 als auch der Inhibitor Faktor H (67) mit MAA-exponierenden Oberflächen interagieren, wurde vermutet, dass beide Proteine unter physiologischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase um die Bindung konkurrieren könnten. Ein Konkurrenz Assay zeigte dabei, dass die Gegenwart von FHR5 de facto eine Reduktion der Faktor H::MAA Interaktion bewirkt (isolierter Faktor H). Wurde FHR5 zu hitzeinaktiviertem Serum hinzugefügt, resultierte dies ebenfalls in einer reduzierten Faktor H Bindung an MAA-exponierende Oberflächen. FHR2 hatte hingegen keinen detektierbaren Einfluss auf die Interaktion. Um die Wirkung von FHR5 auf die Faktor H Bindung aus hitzeinaktiviertem Patientenserum (C3G Patient #638, exprimiert das Hybridprotein FHR2₁₋₂-FHR5 (80)) zu testen, wurde dieses im gleichen Setup mitgeführt. Auffallend war hierbei, dass die Faktor H Bindung im Patientenserum

ohne Zugabe weiterer Proteine bereits signifikant geringer war als in normalem Serum. Dies ist jedoch bei näherer Betrachtung konsistent mit den vorherigen Ergebnissen, da das im Patientenserum vorhandene Hybridprotein mit hoher Intensität an MAA-Epitope bindet und diese somit höchstwahrscheinlich besetzt, sodass die Faktor H Bindung per se reduziert ist. Die Zugabe von rekombinantem FHR5 bewirkte jedoch auch in diesem System eine signifikante Reduktion der Faktor H::MAA-BSA Interaktion, während die Zugabe von FHR2 keinen Effekt zeigte. FHR5 und Faktor H konkurrieren somit um die Bindung an MAA-exponierende Oberflächen.

Um die funktionelle Konsequenz der Konkurrenzbindung zu demonstrieren, wurde schließlich der Einfluss von FHR5 auf die Kofaktoraktivität von MAA-gebundenem Faktor H untersucht. Weismann *et al.* haben, wie bereits erwähnt, gezeigt, dass Faktor H an MAA-Epitope bindet und dort lokal als Kofaktor zur Faktor I vermittelten Degradation von C3b zu iC3b beiträgt (67). Das zentrale Komplementprotein C3 besteht aus einer α -Kette und einer β -Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Zudem existiert eine weitere interne Disulfidbrücke innerhalb der α -Kette. Nach Konvertase-vermittelter C3-Spaltung entstehen so das Anaphylatoxin C3a sowie das Opsonin C3b aus C3. C3b kann nun in Gegenwart des Kofaktors Faktor H durch die Serinprotease Faktor I gespalten werden (153, 154). Hierbei wird die inaktive Form iC3b freigesetzt. iC3b kann nicht an Faktor B binden und verhindert damit die Amplifikation der Komplementkaskade (155). In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass FHR5 die Faktor H-abhängige Spaltung von C3b zu iC3b auf einer MAA-exponierenden Oberfläche reduziert. FHR5 allein hatte keine Kofaktoraktivität, wenngleich dies in früheren Studien beschrieben wurde (79). Die gezeigte Kofaktoraktivität steht jedoch in Gegensatz zur komplementaktivierenden Wirkung von FHR5 und konnte in neueren Studien nicht beobachtet werden (77, 88).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass der Komplementaktivator FHR5 mit dem Komplementinhibitor Faktor H um die Bindung an MAA-exponierende Oberflächen konkurriert und eine Reduktion der iC3b Generierung bewirkt. Unter physiologischen Bedingungen könnte FHR5 so ein gewisses Maß an Komplementaktivität fördern, um die effiziente Beseitigung von modifiziertem körpereigenem Material zu gewährleisten. Die Daten deuten jedoch darauf hin, dass es eine exakte Balance zwischen MAA-gebundenem FHR5 und Faktor H geben muss, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden. Bei C3G Patienten liegen allerdings renale Schäden vor (156), weshalb davon auszugehen ist, dass MAA-Epitope bei diesen Personen in unphysiologischen Mengen exponiert werden. Die erzielten Ergebnisse könnten, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der erhöhten FHR5 Serumkonzentration, eine mögliche Erklärung für die FHR5 Deposition in

den Glomeruli der C3G Patienten liefern. Hierbei erscheint vor allem die Akkumulation im Mesangium plausibel, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die MAA-Exposition bei Mesangialzellen durch Schädigung induziert werden kann.

Neben der Beteiligung der FHR5::MAA Interaktion bei renalen Erkrankungen erscheint es ferner sinnvoll, die Rolle von FHR5 bei der Atherogenese zu untersuchen. Dies ist damit zu begründen, dass MDA-Epitope insbesondere in atherosklerotischen Läsionen zu finden sind und inflammatorische Prozesse begünstigen (140, 157). Die Deposition von FHR5 in Plaques erscheint daher naheliegend.

5.1.3 Laminin-521 trägt zur FHR5 Deposition entlang der GBM bei

Neben der Deposition im Mesangium wird FHR5 bei C3 Glomerulopathie auch entlang der glomerulären Basalmembran abgelagert. Es stellte sich deshalb die Frage, welcher Bindungspartner die Akkumulation des Proteins in diesem Bereich des geschädigten Glomerulus vermittelt. Die GBM bildet gemeinsam mit den fenestrierten Endothelzellen (Kapillarseite) und den Podozyten (Harnseite) die glomeruläre Filtrationsbarriere. Während Makromoleküle und Blutzellen diese Barriere nicht passieren können, ist sie permeabel für Wasser und kleinere gelöste Substanzen. Auf diesem Weg werden Abfallprodukte effizient aus dem Blut entfernt und können letztlich über den Urin aus dem Körper entsorgt werden (120, 158). Auf Molekülebene repräsentiert die GBM eine spezifische extrazelluläre Matrix und besteht vor allem aus Laminin, Kollagen Typ IV, Nidogen und Agrin (159). Alle dieser Komponenten konnten als potentielle Interaktionspartner von FHR5 in Betracht gezogen werden. Dass FHR5 grundsätzlich an EZM-Strukturen binden kann, wurde bereits von Csicsi und Kollegen gezeigt. Für deren Studie wurde kommerziell erhältliches MaxGel als Modell verwendet, welches eine Mischung verschiedener EZM-Bestandteile enthält. Die Bindung an einzelne Komponenten wurde jedoch nicht untersucht (88).

Für die vorliegende Arbeit wurde Laminin, genauer Laminin-521, als potentieller Bindungspartner von FHR5 ausgewählt. Der Fokus wurde auf dieses Molekül gelegt, da Laminine die strukturelle Basis für die Bildung der GBM bilden und Laminin-521 die Hauptisoform der reifen GBM repräsentiert (119, 160). Zudem wurden FHR5 und Laminin durch massenspektroskopische Analysen in Glomeruli von C3G Patienten, nicht aber in Kontrollen, nachgewiesen (161). Durch ein ELISA-basiertes Experiment konnte nun gezeigt werden, dass FHR5 tatsächlich mit Laminin-521 interagiert. Als Interaktionsdomäne für Laminin-521 wurde unter Zuhilfenahme der rekombinant exprimierten Deletionsmutanten die Mittelregion von FHR5 (SCRs 5-7) identifiziert. Diese ist somit identisch

mit der Zellbinde- bzw. MAA-Interaktionsdomäne (82, 83). Ein interessanter Ansatz für zukünftige Experimente ist die Generierung und Expression von Laminin-Mutanten, die unterschiedliche Bereiche des Moleküls repräsentieren. So könnte untersucht werden, an welche Laminin-Domäne FHR5 genau bindet. Dies würde weitere Erkenntnisse über die Interaktion von FHR5 und Laminin geben. Um die physiologische Relevanz der ELISA Daten zu validieren, wurde im Rahmen einer Kooperation mittels *Proximity Ligation Assay* untersucht, ob FHR5 und Laminin in geschädigten Glomeruli entlang der GBM kolokalisieren (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thorsten Wiech, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Tatsächlich wurden FHR5 und Laminin in Nierenbiopsien von Patienten innerhalb der peripheren GBM in enger räumlicher Nähe detektiert. Dies bestätigt die Kolokalisation beider Moleküle entlang der GBM *in vivo*.

Die Daten zeigen, dass Laminin-521 zur FHR5 Deposition innerhalb der GBM im geschädigten Glomerulus beiträgt. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass Laminine ubiquitär im Körper vorhanden sind (162). Es ist somit unwahrscheinlich, dass FHR5 unter physiologischen Bedingungen an Laminine bindet und dort als Anker für den Komplementaktivator Properdin fungiert. Viel mehr ist vorstellbar, dass das glomeruläre Gewebe unter pathologischen Umständen strukturellen Veränderungen unterliegt, welche die Exposition von Laminin begünstigen. Darüber hinaus wird auch die Modifikation von Laminin mit MDA, insbesondere während der Atherogenese, diskutiert (163). Hier sollten sich Studien in Bezug auf renale Erkrankungen anschließen, da eine Verbindung zwischen der Interaktion von FHR5 mit oxidationsspezifischen Epitopen bzw. Laminin und einer anschließenden Immunreaktion bestehen könnte. Des Weiteren wäre es sinnvoll, auch andere EZM-Bestandteile als Bindungspartner von FHR5 in Betracht zu ziehen. Beispielsweise könnte die Bindung von FHR5 an Fibronectin untersucht werden, da MDA-modifiziertes Fibronectin bereits in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde (164). Dies spricht im Übrigen ebenfalls dafür, dass eine Beteiligung von FHR5 bei der Atherogenese untersucht werden sollte.

5.2 MAA- und Laminin-gebundenes FHR5 ist funktionell aktiv und steigert die Komplementaktivität

MAA-Epitope und Laminin tragen zur FHR5 Deposition in geschädigten Glomeruli von C3G Patienten bei. Folglich stellte sich die Frage nach der Konsequenz dieser Interaktion. Wie bereits erwähnt, wirkt FHR5 komplementaktivierend, indem es Properdin über die N-terminalen SCRs 1-2 rekrutiert (77). Darüber hinaus bindet FHR5 das Opsonin

C3b über die C-terminalen SCRs 8-9 (77, 82, 83). FHR5 stellt damit eine Plattform für die Aktivierung und Amplifikation der Komplementkaskade bereit. Es war jedoch unklar, ob MAA- bzw. Laminin-gebundenes FHR5 funktionell aktiv bleibt oder ob die komplementaktivierende Wirkung durch die Interaktion verloren geht. In Bezug auf MAA-exponierende Oberflächen konnte zunächst gezeigt werden, dass die Gegenwart von Serum eines C3G Patienten, welcher das FHR2₁₋₂-FHR5 Hybridprotein exprimiert, im Vergleich zu NHS eine verstärkte C3-Fragmentdeposition bewirkt. Dies ließ bereits darauf schließen, dass FHR5 eine komplementaktivierende Rolle auf MAA-exponierenden Oberflächen vermittelt. Die Vermutung wurde schließlich bestätigt, da sowohl die C3-Fragmentdeposition als auch die C3a-Freisetzung in Gegenwart von NHS durch rekombinantes, MAA-gebundenes FHR5 gesteigert werden konnte. Für die komplementaktivierende Wirkung wurde stets die Anwesenheit des intakten Vollängen-Proteins benötigt. Die MAA-bindende Deletionsmutante FHR₅₋₇ allein hat die Funktion nicht vermittelt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die komplementaktivierende Wirkung von FHR5 erhalten bleibt, nachdem es an MAA-Epitope gebunden hat. Konsistent mit diesen Ergebnissen konnte auch die komplementaktivierende Wirkung von Laminin-gebundenem FHR5 bestätigt werden. FHR5 wird demnach über MAA-Oberflächen und exponiertes Laminin-521 in geschädigten Glomeruli abgelagert und bewirkt dort die Erhöhung der Komplementaktivität.

Die Daten untermauern die Hypothese, dass FHR5 durch seine lokale Wirkung im gesunden Organismus an der Beseitigung von modifiziertem endogenem Material beteiligt sein könnte. Werden MAA-Epitope unter physiologischen Bedingungen, beispielsweise auf apoptotischen Zellen, lokal begrenzt exponiert, übt FHR5 in Wechselwirkung mit Faktor H eine positive Funktion in der Immunhomöostase aus. Da MAA-Epitope durch die renale Schädigung bei C3-Glomerulopathie (156) höchstwahrscheinlich in unphysiologischer Menge exponiert werden und Laminin-521 strukturell zugänglich wird, könnte FHR5 während des Krankheitsverlaufs im Glomerulus akkumulieren und folglich durch Auslösen einer überschießenden Komplementaktivität weitere Schäden verursachen.

5.3 Oberflächengebundenes FHR5 hat einen proinflammatorischen Effekt auf humane Monozyten

Die Aktivierung des Komplementsystems bewirkt die Rekrutierung von Immunzellen. Dies wird insbesondere durch die Spaltung der Komplementproteine C3 und C5 und die daraus resultierende Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a erreicht (21, 141-143, 165). Da FHR5 über MAA-Epitope und Laminin-521 in geschädigten Glomeruli abgelagert wird und dort höchstwahrscheinlich eine übermäßige Aktivierung des

Komplementsystems induziert, stellte sich die Frage, ob FHR5 einen modulierenden Einfluss auf zelluläre Teile des angeborenen Immunsystems ausübt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob oberflächengebundenes FHR5 die Funktion von humanen Monozyten beeinflusst.

Monozyten zirkulieren als Teil des mononukleär-phagozytären Systems im Blut und machen dabei ca. 10 % der Leukozyten-Population aus. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen aus denen auch Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten hervorgehen und werden später ins periphere Blut freigesetzt. Dieser Prozess wird als Myelopoese bezeichnet (166, 167). Die Expression spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche erlaubt, beispielsweise während einer Infektion, die Einwanderung der Monozyten vom Blut ins Gewebe (168). Als Teil des mononukleär-phagozytären Systems besitzen Monozyten Phagozytoseaktivität und sind so an der Beseitigung von verändertem endogenem Material sowie infektiösen Erregern beteiligt. Darüber hinaus sind sie in der Lage Zytokine zu produzieren und üben so immunmodulatorische Funktionen aus. Monozyten können sich durch spezifische Stimuli in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren und fungieren damit zudem als Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort (168-170).

Um die Konsequenzen der komplementaktivierenden Wirkung von FHR5 auf Monozyten zu testen, wurde das Protein auf einer Oberfläche immobilisiert und mit frisch isolierten Monozyten in Gegenwart von NHS kokubiert. FHR5 induzierte unter diesen Bedingungen die Sekretion von proinflammatorisch wirkendem TNF α . Des Weiteren steigerte FHR5 in Anwesenheit von LPS die Freisetzung von TNF α und bewirkte eine Reduktion von antiinflammatorischem IL-10. LPS führt nachweislich zur Induktion der TNF α und IL-10 Freisetzung in Monozyten (144, 145). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass oberflächengebundenes FHR5 proinflammatorisch auf humane Monozyten wirkt. Kürzlich wurde gezeigt, dass das Komplement Faktor H verwandte Protein 1 (FHR1) die Aktivierung des Inflammasoms induziert und auf diesem Weg die sterile Inflammation vermittelt (171). Die Literaturangaben zur Heterodimerbildung zwischen FHR5 und FHR1 sind jedoch, wie bereits erwähnt, kontrovers. So ist bis dato unklar, ob beide Proteine Heterodimere über das N-terminale Ende (SCRs 1-2) ausbilden können und diese *in vivo* im Serum zirkulieren (72, 81). Somit bleibt offen, ob FHR5 und FHR1 synergistisch wirken und humane Monozyten beeinflussen oder ob die Proteine ihren Effekt getrennt voneinander vermitteln.

Anhand der bisher gezeigten Daten wurde spekuliert, dass FHR5 unter physiologischen Bedingungen an der Eliminierung von modifiziertem Zellmaterial bzw. -debris beteiligt ist. So wurde vermutet, dass FHR5 in Konkurrenz mit Faktor H an veränderte, MAA-

exponierende Oberflächen bindet, dort das Komplementsystem lokal aktiviert und anschließend die Kaskade durch Rückbindung von C3b amplifiziert (82). Die Freisetzung von C3a könnte daraufhin zur Rekrutierung von Monozyten führen (141-143), welche opsonisierte Zellen letztendlich durch Phagozytose beseitigen. Monozyten exprimieren unter anderem den Komplementrezeptor CR1 auf ihrer Oberfläche, der an der C3b-vermittelten Phagozytose beteiligt ist (13, 172, 173). Kemper und Kollegen konnten vor einigen Jahren bereits zeigen, dass Properdin über die Steigerung der Komplementaktivität und der damit einhergehenden C3b-Generierung an der Beseitigung von apoptotischen T-Zellen durch Phagozyten mitwirkt (174). Zur Untersuchung der aufgestellten Hypothese wurde die Rolle von FHR5 bei der Phagozytose evaluiert. FHR5 wurde dafür mit apoptotischen Zellen vorinkubiert und anschließend mit humanen Monozyten in Gegenwart von NHS koinkubiert. Da zellgebundenes-FHR5 die C3b Deposition in Anwesenheit von normalem Serum verstärkt (77), wurde erwartet, dass die Phagozytoserate durch die Vorinkubation erhöht wird. Die Gegenwart von FHR5 bewirkte dabei tatsächlich eine Steigerung der Phagozytoserate. FHR5 könnte somit unter physiologischen Bedingungen tatsächlich zur Eliminierung veränderter Zellen beitragen. Da der Effekt jedoch nicht signifikant war, sollten sich hier weitere Experimente anschließen. Zunächst könnten anstelle von HUVECs andere Zelltypen, wahlweise primäre Zellen, verwendet werden. Auch die Art des Zelltodes könnte eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung spielen. So könnten nekrotische oder unter inflammatorischen Bedingungen kultivierte Zellen in den Versuchsaufbau eingeschlossen werden. Des Weiteren ist es sinnvoll, den Versuch mit anderen phagozytierenden Zellen, wie beispielsweise Makrophagen oder dendritischen Zellen, zu wiederholen.

5.4 FHR5 verstärkt bestehende Nierenschäden

C3-Glomerulopathie ist eine schwerwiegende und schnell fortschreitende Nierenerkrankung, die bei rund der Hälfte aller Patienten innerhalb eines Jahrzehnts zu terminaler Niereninsuffizienz führt (127). Dieses Stadium bezeichnet einen Zustand, bei dem die Nierenfunktion eines Patienten soweit zurückgegangen ist, dass dieser nur durch Dialyse oder Organtransplantation überleben kann (175). Jedoch ist auch die Rezidivrate nach einer Transplantation bei C3G Patienten mit 45-60 % sehr hoch (127). Dies hebt die kontinuierliche Schädigung des Nierengewebes durch das Krankheitsgeschehen hervor. Histomorphologisch betrachtet, sind die glomerulären Schäden bei C3G

Patienten relativ divers und reichen von mesangial- und membranproliferativen über endo- sowie extrakapillärproliferativen Veränderungen (156).

Um die Rolle von FHR5 bei der Schädigung des Nierengewebes zu untersuchen, wurde zunächst getestet, inwiefern FHR5 die Vitalität von intakten primären humanen Mesangialzellen beeinflusst. Die Gegenwart von FHR5 hatte keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen. Aus diesem Ergebnis wird postuliert, dass FHR5 allein keinen toxischen oder schädigenden Einfluss auf intakte renale Zellen ausübt. Im Gegensatz dazu verstärkte FHR5 bestehende Schäden von Mesangialzellen. Die Zugabe von humanem Serum zum Kulturmedium bewirkte per se eine dosisabhängige Schädigung der primären Zellen und eine damit einhergehende Exposition von MAA-Epitopen auf der Oberfläche. War zusätzlich zum Serum rekombinantes FHR5 im Medium vorhanden, wurde die Schädigung der Mesangialzellen weiter verstärkt. Dieser Effekt kann durch die komplementaktivierende Wirkung des Proteins auf modifizierten Oberflächen erklärt werden. Natürlich stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob Mesangialzellen zu ihrem Schutz Komplementregulatoren auf der Zelloberfläche exprimieren. In einem Review von Schlöndorff und Banas aus dem Jahr 2009 sind verschiedenste Rezeptoren aufgeführt, die auf kultivierten Mesangialzellen nachgewiesen werden konnten. Es sind hier jedoch keine Komplementrezeptoren gelistet (118). Frühe Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse zu dieser Fragestellung. Einerseits wurde von Cosio *et al.* gezeigt, dass intraglomeruläre Mesangialzellen unter physiologischen Umständen CD55 (DAF) negativ sind (176), während eine andere Studie geringe Mengen der membranständigen Komplementregulatoren CD55 und CD46 (MCP) auf Mesangialzellen nachgewiesen hat (177). Weitere Untersuchungen haben dagegen gezeigt, dass die Expression der Regulatorproteine CD55 und CD59 nach Aktivierung des Komplementsystems durch Immunkomplexe induziert werden kann (178, 179). Aufgrund der kontroversen Datenlage ist es notwendig, die Expression verschiedener membranständiger Komplementregulatoren auf der Oberfläche von Mesangialzellen genau zu charakterisieren. Außerdem sollte validiert werden, dass die gezeigte NHS induzierte Schädigung tatsächlich komplementvermittelt ist. Das Mesangium ist unter physiologischen Umständen aufgrund seiner Lokalisation vom vaskulären Kompartiment durch die fenestrierten Endothelzellen abgetrennt. Mesangialzellen kommen daher nur mit Komponenten in Kontakt, welche diese Barriere passieren können (180). Durch pathophysiologische Umstände erfährt der Glomerulus jedoch strukturelle Veränderungen, welche den Kontakt mit Serumbestandteilen, unter anderem Komplementkomponenten, begünstigen könnten.

Humane Mesangialzellen können zytokin- oder immunglobulininduziert verschiedene Zytokine wie IL-6, IL-8, MCP1 oder TGF- β 1 sekretieren (181-183). Da FHR5 die Zytokin-

Antwort von Monozyten steuert, könnte der Komplementaktivator weiterhin die Zytokin-Sekretion von Mesangialzellen modulieren und auf diese Weise Einfluss auf das Krankheitsgeschehen bei C3G nehmen. Da es diesbezüglich bisher keine Untersuchungen gibt, sollte die Vermutung zukünftig experimentell aufgearbeitet werden.

5.5 Die Rolle von FHR5 in der Immunhomöostase und bei der Pathogenese von C3-Glomerulopathie

Zusammenfassend bringen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sowohl neue Erkenntnisse über die Funktion von FHR5 in der Immunhomöostase als auch über die Rolle des Proteins bei der Pathogenese von C3-Glomerulopathie.

Als physiologische Funktion von FHR5 kann die Beteiligung des Proteins an der Eliminierung von modifiziertem körpereigenem Material, wie beispielsweise apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie Zelldebris, in Betracht gezogen werden (Abbildung 30). FHR5 zirkuliert als Homodimer im Plasma (72, 81). Kommt das Protein mit Zellmaterial in Kontakt, welches durch vorangegangene Schädigung oxidationsspezifische MAA-Epitope exponiert, bindet FHR5 über diesen Liganden an die modifizierte Oberfläche. Die Interaktion wird dabei über die Mitteldomäne (SCRs 5-7) des Proteins vermittelt (82, 83). FHR5 konkurriert bei der Bindung an MAA-Epitope mit dem Komplementinhibitor Faktor H und blockiert so dessen komplementinhibierende Wirkung auf der oxidationsspezifischen Oberfläche (67). MAA-gebundenes FHR5 rekrutiert anschließend Properdin über die SCRs 1-2 (77) und initiiert damit die Spaltung von C3 in C3a und C3b. Freigesetztes C3b kann nun an den C-Terminus von FHR5 (SCRs 8-9) zurückbinden (82, 83) und induziert so die Amplifikation des Systems und die Opsonisierung des modifizierten Materials. Interessanterweise konnte durch elektronenmikroskopische Strukturanalysen gezeigt werden, dass pro FHR5 Dimer höchstwahrscheinlich zwei Moleküle C3b gebunden werden (Daten nicht gezeigt, aktuelle Kooperation mit Arbeitsgruppe Prof. Marc Thilo Figge, Angewandte Systembiologie, HKI Jena und Dr. Martin Westermann, Elektronenmikroskopisches Zentrum, Universitätsklinikum Jena). Dies verifiziert die Annahme, dass FHR5 freigesetztes C3b über die beiden freien C-Termini rekrutiert. Die Produktion von C3a könnte die Rekrutierung von Monozyten bewirken, welche durch oberflächengebundenes FHR5 zur kontrollierten Sekretion proinflammatorischer Zytokine stimuliert werden. FHR5 könnte auf diese Weise die Phagozytose des opsonierten Materials begünstigen.

Es ist jedoch hervorzuheben, dass die präzise Balance der FHR5 und Faktor H Bindung an MAA-Epitope im gesunden Organismus eine entscheidende Rolle für die

Aufrechterhaltung der Immunhomöostase zu spielen scheint. Faktor H könnte durch seine komplementinhibierende Wirkung auf MAA-Oberflächen eine überschießende Immunantwort verhindern (67), während FHR5 die lokal begrenzte Komplementaktivierung begünstigt. Dies könnte zur raschen Beseitigung des MAA-exponierenden Materials durch Phagozyten führen.

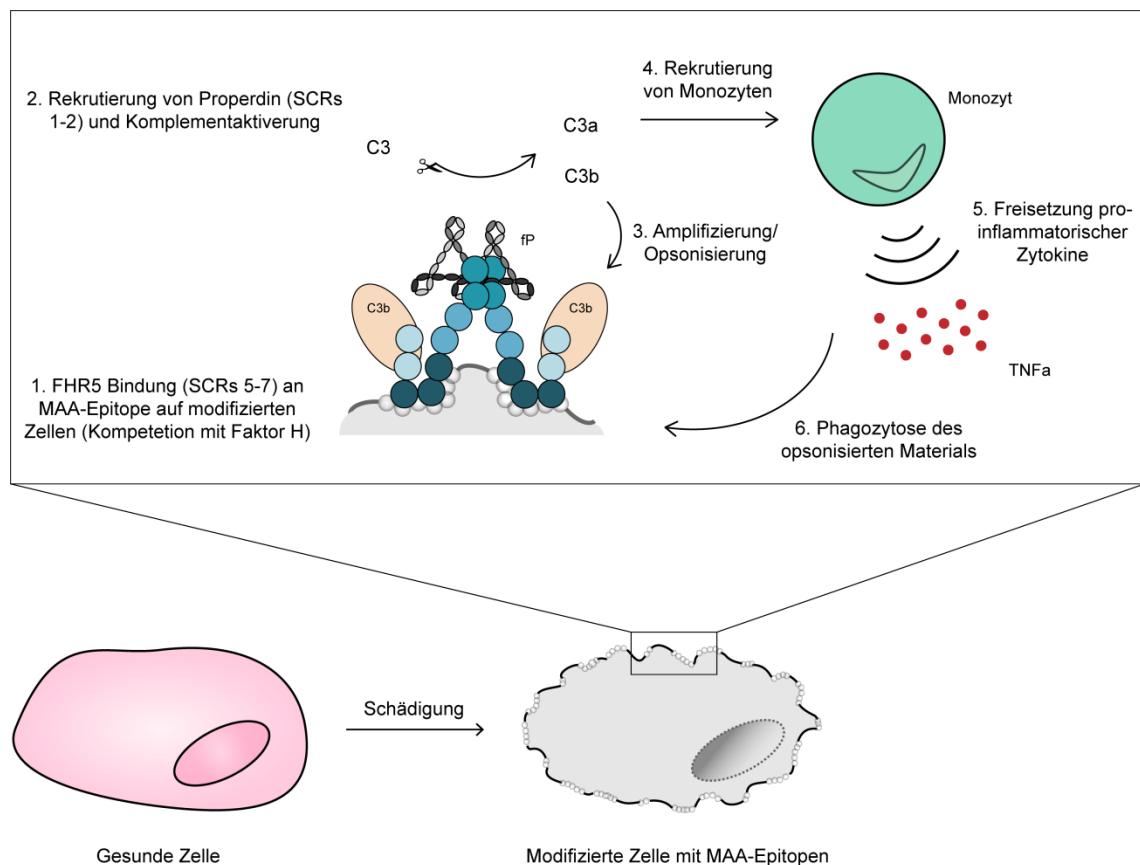


Abbildung 30: Funktion von FHR5 in der Immunhomöostase. Kommt es zur Schädigung einer Zelle, beispielsweise durch Apoptose, werden MAA-Epitope auf der Zelloberfläche exponiert. FHR5 (Homodimer) bindet über die SCRs 5-7 an exponierte MAA-Epitope und konkurriert dabei mit dem Komplementinhibitor Faktor H (1). MAA-gebundenes FHR5 rekrutiert Properdin über die N-terminalen SCRs 1-2 und bewirkt so die Aktivierung des Komplementsystems (2). Durch Spaltung von C3 werden C3a und C3b freigesetzt. C3b kann an den C-Terminus (SCRs 8-9) von FHR5 binden und begünstigt damit die Amplifizierung des Systems sowie die Opsonisierung des veränderten Materials (3). Durch Freisetzung des Anaphylatoxins C3a werden Monozyten rekrutiert (4) und über oberflächengebundenes FHR5 zur Sekretion von TNFα angeregt (5). Das opsonisierte Material kann schließlich durch die rekrutierten Monozyten phagozytiert werden (6). Durch Konkurrenz von FHR5 und Faktor H um die Bindung an MAA-Epitope könnte eine präzise Balance zwischen Komplementaktivierung und -inhibition gewährleistet werden, welche die schnelle Beseitigung von verändertem körpereigenem Material erlaubt. Durch die lokale und

spezifische Funktion ist die Wirkung von FHR5 physiologisch höchstwahrscheinlich zeitlich und räumlich begrenzt.

Als Auslöser für C3-Glomerulopathie werden verschiedene Faktoren diskutiert. Häufig geht der Erkrankung eine (Streptokokken-) Infektion voraus, die möglicherweise der Ausgangspunkt der Erkrankung ist (125). Daneben wurden zahlreiche Mutationen im *Faktor H/CFHR* Gencluster identifiziert, die zur Expression abnormer Proteine führen und mit der Pathogenese von C3G assoziiert sind. So konnten unter Beteiligung von FHR5 die Hybridproteine FHR2₁₋₂-FHR5, FHR5₁₋₂-FHR2, FHR5₁₋₂-FHR5 bei einigen Patienten nachgewiesen werden (80, 92-94). Bei zwei C3G-Patienten, welche das Hybridprotein FHR2₁₋₂-FHR5 exprimieren, konnte der Pathomechanismus beispielsweise weitestgehend aufgeklärt werden. So bildet das Hybridprotein aufgrund der Gegenwart der N-terminalen Domäne (SCRs 1-2) von FHR2 Multimere aus und ist damit in der Lage mehr Properdin zu rekrutieren als das Wildtyp-Protein FHR5. Durch die Deregulation der C3-Konvertase kommt es zur übermäßigen Komplementaktivierung, was die Schädigung des glomerulären Gewebes begünstigt (80). Es können jedoch nicht bei allen C3G Patienten FHR5 Hybridproteine nachgewiesen werden. Da die Mutationen oftmals familiär vorkommen und damit auf einen kleineren Personenkreis beschränkt sind, konnte der allgemeine Pathomechanismus der Erkrankung bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Da auch das Wildtyp-Protein FHR5, ohne nachgewiesene Mutationen im *CFHR5* Gen, in Glomeruli von C3G Patienten abgelagert ist, könnte dieses Protein möglicherweise ein Ansatzpunkt für die Aufklärung des Pathomechanismus bzw. für die Therapie einer größeren Patientengruppe sein. Es stellte sich daher natürlich zunächst die Frage, aus welchen Gründen FHR5 im Glomerulus deponiert wird und welche Rolle das Protein bei der Pathogenese von C3-Glomerulopathie spielt. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse wird angenommen, dass ein initiales Ereignis zur Zerstörung der zellulären Integrität und zur Veränderung des glomerulären Gewebes führt. Welche Faktoren hier eine Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Schädigung des Gewebes führt jedoch höchstwahrscheinlich zur Akkumulation oxidationsspezifischer MAA-Epitope im Mesangium. Weiterhin könnten strukturelle Veränderungen die Exposition von Laminin-521 entlang glomerulären Basalmembran fördern. Beide exponierten Liganden begünstigen die Bindung von FHR5, welches so in den Glomeruli der Niere abgelagert wird (Abbildung 31). Welche Rolle die höheren Serumlevel bei C3G Patienten dabei spielen, muss zukünftig geklärt werden. Durch die Deposition von FHR5 auf MAA-exponierenden Oberflächen sowie Laminin-521 und der damit verbundenen Akkumulation des Proteins kommt es anschließend zur übermäßigen Aktivierung der Komplementkaskade, welche durch vermehrte Bildung von C3b amplifiziert wird. Die Freisetzung großer Mengen C3a

kann inflammatorische Prozesse begünstigen sowie zur übermäßigen Rekrutierung von Monozyten führen. Die rekrutierten Immunzellen werden schließlich durch das, im Überschuss vorhandene, FHR5 zur Sezernierung proinflammatorischer Zytokine stimuliert und begünstigen damit die intraglomeruläre Inflammation. Dies könnte schließlich zur weiteren Schädigung des Gewebes und damit einhergehend zur Exposition weiterer MAA-Epitope führen. Durch diese Rückkopplung könnte der Kreislauf erneut beginnen und durch Gewebeschädigung eine Verschlechterung der Nierenfunktion nach sich ziehen (*circulus vitiosus*). Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass FHR5 nicht der Initiator von C3-Glomerulopathie zu sein scheint, sondern erst als sekundärer Faktor zur Pathogenese beiträgt.

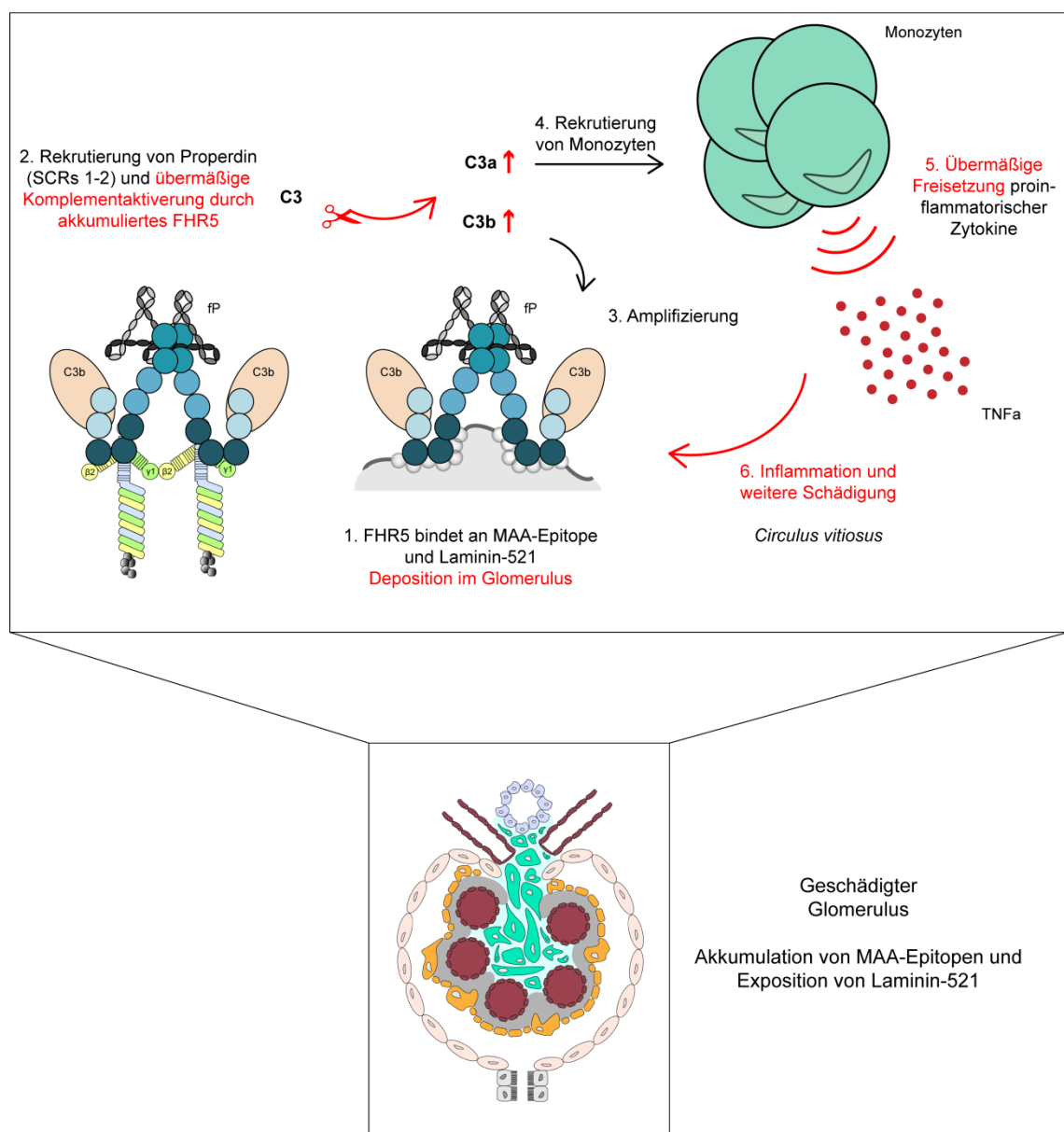


Abbildung 31: Rolle von FHR5 bei der Pathogenese von C3G. Die Schädigung des glomerulären Gewebes führt im Rahmen der Erkrankung höchstwahrscheinlich zur Akkumulation oxidationsspezifischer MAA-Epitope. Zusätzlich könnten strukturelle Veränderungen die Exposition von Laminin-521 entlang der glomerulären Basalmembran begünstigen. Beide Liganden

erlauben die Bindung von FHR5, welches so in den Glomeruli der Niere abgelagert wird (1). Durch Deposition von FHR5 auf MAA-exponierenden Oberflächen und Laminin-521 und der damit verbundenen räumlichen Akkumulation des Proteins kommt es zur übermäßigen Aktivierung des Komplementsystems (2), welche durch vermehrte Bildung von C3b zusätzlich verstärkt wird (3). Die Sekretion großer Mengen C3a führt im Verlauf zur verstärkten Rekrutierung von Monozyten (4). Diese werden schließlich durch oberflächengebundenes FHR5 zur Sezernierung von TNF α stimuliert (5) und begünstigen damit inflammatorische Prozesse innerhalb des Glomerulus. Dies könnte zur weiteren Schädigung des Gewebes führen (6), was die Exposition neuer MAA-Epitope begünstigt. Durch die dargestellte Rückkopplung könnte der Kreislauf erneut beginnen und durch fortwährende Schädigung eine Verschlechterung der Nierenfunktion bewirken (*circulus vitiosus*). Die Funktion von FHR5 ist im Rahmen von C3G vermutlich nicht mehr lokal begrenzt und hat auf diese Weise negative Auswirkungen auf den Erkrankungsverlauf.

Zusammenfassend wird also postuliert, dass FHR5 durch seine Rolle bei der Eliminierung von verändertem körpereigenem Material im gesunden Organismus eine wichtige und schützende Funktion ausübt. Kommt es jedoch während des Krankheitsgeschehens bei C3G zu Gewebeveränderungen in Glomeruli der Nieren, akkumuliert FHR5 dort und die Wirkung des Proteins ist nicht mehr lokal begrenzt. Auf diese Weise ist das Gleichgewicht hin zur Komplementaktivierung verschoben, wodurch Nierenschäden begünstigt werden. Besonders kritisch ist die Situation bei Patienten, die zusätzlich FHR5 Hybridproteine exprimieren. Diese binden noch stärker an exponierte Bindungspartner auf verändertem Gewebe und führen durch Multimerbildung zu einer noch stärkeren Komplementaktivierung als das Wildtyp-Protein.

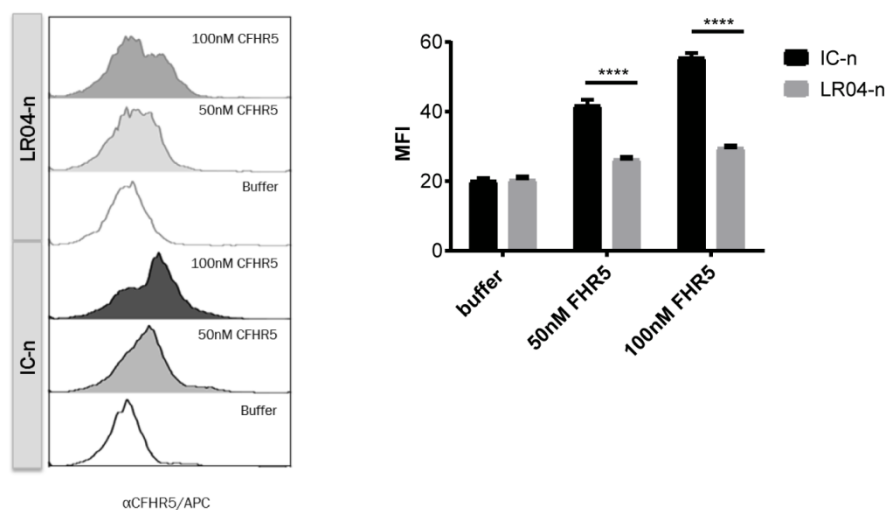
5.6 Relevanz der Ergebnisse für therapeutische Ansätze

Derzeit existiert keine spezifische Behandlungsmöglichkeit zur Therapie von C3-Glomerulopathie. Obwohl eine Behandlung mit dem C5-spezifischen monoklonalen Antikörper Eculizumab zu Beginn vielversprechend erschien, zeigten Studien mit größeren Kohorten, dass nur ein Teil der Patienten auf die Therapie anspricht (184, 185). Momentan werden weitere Komplementinhibitoren in klinischen Studien getestet, die auf unterschiedlichen Ebenen der Kaskade wirken. Unter anderem sind hier der Faktor B-Inhibitor LNP023, der Faktor D-Antagonist ACH4471 oder der C3-Inhibitor AMY-101 zu nennen (186). Die globale „unspezifische“ Inhibition des Komplementsystems erscheint natürlich sinnvoll, da so alle negativen Auswirkungen einer Überaktivierung, wie beispielsweise Inflammation und Gewebeschädigungen, blockiert werden. Dies würde dementsprechend auch auf die fehlgeleitete Funktion von FHR5 durch die Akkumulation auf veränderten Oberflächen bei C3-Glomerulopathie abzielen und dieser entgegenwirken. Aufgrund der zentralen Rolle des Komplementsystems bei der Aufrechterhaltung der Homöostase durch die Eliminierung von verändertem endogenen Material und Pathogenen, gibt es jedoch auch negative Aspekte einer globalen Inhibition. Hier sei

insbesondere die Anfälligkeit der Patienten gegenüber schwerwiegender Infektionen, beispielsweise durch die bakteriellen Erreger *Neisseria meningitidis* oder *Streptococcus pneumoniae*, erwähnt (187). Erstrebenswerter als die globale Inhibition des Systems ist daher die spezifische Blockade einzelner Komplementregulatoren. Dies gelingt jedoch nur, wenn die Funktion und Wirkungsweise der Regulatorproteine vollständig verstanden ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Komplementaktivator FHR5 durch Bindung an geschädigtes glomeruläres Gewebe zur Pathogenese von C3-Glomerulopathie beiträgt. So wird FHR5 zunächst über die Interaktion mit MAA-Epitopen und Laminin-521 in der Niere deponiert. Hypothetisch betrachtet, könnte die Deposition von FHR5 durch die Blockierung der Oberflächenbindedomäne (SCRs 5-7) inhibiert werden (82). So könnte die Schädigung des glomerulären Gewebes durch die komplementaktivierende Wirkung von FHR5 eventuell reduziert werden. Zum derzeitigen Zeitpunkt kann jedoch nur spekuliert werden, ob sich die Inhibierung der Interaktion positiv auswirkt. Hierzu sollten zunächst *in vitro* Untersuchungen folgen.

Anhang



Ergänzende Abbildung 1: FHR5 bindet über MAA-Epitope an veränderte Zellen. Apoptotische Jurkat Zellen wurden durch Immundepletion in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion exponierte eine hohe Menge an MAA-Epitopen (MAA^{high} = IC-n) auf der Zelloberfläche, die andere eine geringe Menge (MAA^{low} \triangleq LR04-n). Anschließend wurden beide Fraktionen mit rekombinantem FHR5 (50 nM und 100 nM) inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch unter Verwendung eines FHR5 spezifischen Antiserums detektiert. FHR5 hat mit signifikant höherer Intensität an Zellen gebunden, die viele MAA-Epitope auf ihrer Oberfläche exponierten (MAA^{high} \triangleq IC-n). Dieser Versuch wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. Nikolina Papac-Milicevic (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Binder, Medizinische Universität Wien) durchgeführt sowie ausgewertet und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Literaturverzeichnis

1. Parkin, J., and B. Cohen. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777-1789.
2. Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125: S3-23.
3. Peng, Y., D. A. Martin, J. Kenkel, K. Zhang, C. A. Ogden, and K. B. Elkon. 2007. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun* 29: 303-309.
4. Hochreiter-Hufford, A., and K. S. Ravichandran. 2013. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008748.
5. Horn, F. 2009. Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4. aktualisierte und erweiterte Auflage. *Thieme Verlag*.
6. Clark, R., and T. Kupper. 2005. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 125: 629-637.
7. Turvey, S. E., and D. H. Broide. 2010. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S24-32.
8. Hoffmann, J., and S. Akira. 2013. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 25: 1-3.
9. Janeway, C. A., Jr., P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik. 2002. Immunologie 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin*.
10. Mogensen, T. H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240-273, Table of Contents.
11. Hernandez, C., P. Huebener, and R. F. Schwabe. 2016. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* 35: 5931-5941.
12. Venereau, E., C. Ceriotti, and M. E. Bianchi. 2015. DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in immunology* 6: 422.
13. Zipfel, P. F., and C. Skerka. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9: 729-740.
14. Yatim, K. M., and F. G. Lakkis. 2015. A Brief Journey through the Immune System. *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 1274-1281.
15. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. Molecular Biology of the Cell Fifth Edition.
16. Parker, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11: 331-360.
17. Nesargikar, P. N., B. Spiller, and R. Chavez. 2012. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2: 103-111.
18. Lubbers, R., M. F. van Essen, C. van Kooten, and L. A. Trouw. 2017. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol* 188: 183-194.
19. Arbore, G., C. Kemper, and M. Kolev. 2017. Intracellular complement - the complosome - in immune cell regulation. *Mol Immunol*.
20. Zimmer, J., J. Hobkirk, F. Mohamed, M. J. Browning, and C. M. Stover. 2014. On the Functional Overlap between Complement and Anti-Microbial Peptides. *Frontiers in immunology* 5: 689.
21. Merle, N. S., R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. 2015. Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology* 6: 257.
22. Noris, M., and G. Remuzzi. 2013. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 33: 479-492.

23. Peng, Q., K. Li, H. Patel, S. H. Sacks, and W. Zhou. 2006. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J Immunol* 176: 3330-3341.
24. Strainic, M. G., J. Liu, D. Huang, F. An, P. N. Lalli, N. Muqim, V. S. Shapiro, G. R. Dubyak, P. S. Heeger, and M. E. Medof. 2008. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity* 28: 425-435.
25. Heeger, P. S., P. N. Lalli, F. Lin, A. Valujskikh, J. Liu, N. Muqim, Y. Xu, and M. E. Medof. 2005. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *The Journal of experimental medicine* 201: 1523-1530.
26. Lipp, A. M., K. Juhasz, C. Paar, C. Ogris, P. Eckerstorfer, R. Thuenauer, J. Hesse, B. Nimmervoll, H. Stockinger, G. J. Schutz, U. Bodenhofer, Z. Balogi, and A. Sonnleitner. 2014. Lck mediates signal transmission from CD59 to the TCR/CD3 pathway in Jurkat T cells. *PLoS One* 9: e85934.
27. Cardone, J., G. Le Friec, P. Vantourout, A. Roberts, A. Fuchs, I. Jackson, T. Suddason, G. Lord, J. P. Atkinson, A. Cope, A. Hayday, and C. Kemper. 2010. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat Immunol* 11: 862-871.
28. Carroll, M. C. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 981-986.
29. Carter, R. H., and D. T. Fearon. 1992. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256: 105-107.
30. Liszewski, M. K., M. Kolev, G. Le Friec, M. Leung, P. G. Bertram, A. F. Fara, M. Subias, M. C. Pickering, C. Drouet, S. Meri, T. P. Arstila, P. T. Pekkarinen, M. Ma, A. Cope, T. Reinheckel, S. Rodriguez de Cordoba, B. Afzali, J. P. Atkinson, and C. Kemper. 2013. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39: 1143-1157.
31. Arbore, G., E. E. West, R. Spolski, A. A. B. Robertson, A. Klos, C. Rheinheimer, P. Dutow, T. M. Woodruff, Z. X. Yu, L. A. O'Neill, R. C. Coll, A. Sher, W. J. Leonard, J. Kohl, P. Monk, M. A. Cooper, M. Arno, B. Afzali, H. J. Lachmann, A. P. Cope, K. D. Mayer-Barber, and C. Kemper. 2016. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science* 352: aad1210.
32. Satyam, A., L. Kannan, N. Matsumoto, M. Geha, P. H. Lapchak, R. Bosse, G. P. Shi, J. J. Dalle Lucca, M. G. Tsokos, and G. C. Tsokos. 2017. Intracellular Activation of Complement 3 Is Responsible for Intestinal Tissue Damage during Mesenteric Ischemia. *J Immunol* 198: 788-797.
33. Ghebrehiwet, B. 2016. The complement system: an evolution in progress. *F1000Res* 5: 2840.
34. Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11: 785-797.
35. Sarma, J. V., and P. A. Ward. 2011. The complement system. *Cell Tissue Res* 343: 227-235.
36. Betz, S. J., and H. Isliker. 1981. Antibody-independent interactions between *Escherichia coli* J5 and human complement components. *J Immunol* 127: 1748-1754.
37. Tenner, A. J., R. J. Ziccardi, and N. R. Cooper. 1984. Antibody-independent C1 activation by *E. coli*. *J Immunol* 133: 886-891.
38. Cooper, N. R., F. C. Jensen, R. M. Welsh, Jr., and M. B. Oldstone. 1976. Lysis of RNA tumor viruses by human serum: direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway. *The Journal of experimental medicine* 144: 970-984.
39. Korb, L. C., and J. M. Ahearn. 1997. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* 158: 4525-4528.

40. Nauta, A. J., L. A. Trouw, M. R. Daha, O. Tijsma, R. Nieuwland, W. J. Schwaeble, A. R. Gingras, A. Mantovani, E. C. Hack, and A. Roos. 2002. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol* 32: 1726-1736.
41. Ricklin, D., E. S. Reis, and J. D. Lambris. 2016. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nat Rev Nephrol* 12: 383-401.
42. Beltrame, M. H., S. J. Catarino, I. Goeldner, A. B. Boldt, and I. J. de Messias-Reason. 2014. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front Pediatr* 2: 148.
43. Dobo, J., D. Szakacs, G. Oroszlan, E. Kortvely, B. Kiss, E. Boros, R. Szasz, P. Zavodszky, P. Gal, and G. Pal. 2016. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. *Sci Rep* 6: 31877.
44. Dobo, J., A. Kocsis, and P. Gal. 2018. Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases. *Frontiers in immunology* 9: 1851.
45. Banda, N. K., M. Takahashi, K. Takahashi, G. L. Stahl, S. Hyatt, M. Glogowska, T. A. Wiles, Y. Endo, T. Fujita, V. M. Holers, and W. P. Arend. 2011. Mechanisms of mannan-binding lectin-associated serine proteases-1/3 activation of the alternative pathway of complement. *Mol Immunol* 49: 281-289.
46. Yaseen, S., G. Demopoulos, T. Dudler, M. Yabuki, C. L. Wood, W. J. Cummings, L. W. Tjoelker, T. Fujita, S. Sacks, P. Garred, P. Andrew, R. B. Sim, P. J. Lachmann, R. Wallis, N. Lynch, and W. J. Schwaeble. 2017. Lectin pathway effector enzyme mannan-binding lectin-associated serine protease-2 can activate native complement C3 in absence of C4 and/or C2. *FASEB J* 31: 2210-2219.
47. Mathern, D. R., and P. S. Heeger. 2015. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol*.
48. Nordahl, E. A., V. Rydengard, P. Nyberg, D. P. Nitsche, M. Morgelin, M. Malmsten, L. Bjorck, and A. Schmidtchen. 2004. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16879-16884.
49. Dunkelberger, J. R., and W. C. Song. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20: 34-50.
50. Fosbrink, M., F. Niculescu, and H. Rus. 2005. The role of c5b-9 terminal complement complex in activation of the cell cycle and transcription. *Immunol Res* 31: 37-46.
51. Podack, E. R., G. Biesecker, and H. J. Muller-Eberhard. 1979. Membrane attack complex of complement: generation of high-affinity phospholipid binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 897-901.
52. Ricklin, D., and J. D. Lambris. 2013. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol* 190: 3831-3838.
53. Medjeral-Thomas, N., and M. C. Pickering. 2016. The complement factor H-related proteins. *Immunol Rev* 274: 191-201.
54. Skerka, C., Q. Chen, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. 2013. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol* 56: 170-180.
55. Pouw, R. B., D. W. Vredevoogd, T. W. Kuijpers, and D. Wouters. 2015. Of mice and men: The factor H protein family and complement regulation. *Mol Immunol* 67: 12-20.
56. Norman, D. G., P. N. Barlow, M. Baron, A. J. Day, R. B. Sim, and I. D. Campbell. 1991. Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol* 219: 717-725.
57. Jozsi, M., A. Tortajada, B. Uzonyi, E. Goicoechea de Jorge, and S. Rodriguez de Cordoba. 2015. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol* 36: 374-384.

58. Jozsi, M., and P. F. Zipfel. 2008. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol* 29: 380-387.
59. Zipfel, P. F., and C. Skerka. 1999. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 20: 135-140.
60. Oppermann, M., T. Manuelian, M. Jozsi, E. Brandt, T. S. Jokiranta, S. Heinen, S. Meri, C. Skerka, O. Gotze, and P. F. Zipfel. 2006. The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin Exp Immunol* 144: 342-352.
61. Ferreira, V. P., M. K. Pangburn, and C. Cortes. 2010. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol* 47: 2187-2197.
62. Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong, and D. M. Lublin. 1995. Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol* 155: 348-356.
63. Whaley, K., and S. Ruddy. 1976. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *The Journal of experimental medicine* 144: 1147-1163.
64. Weiler, J. M., M. R. Daha, K. F. Austen, and D. T. Fearon. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 3268-3272.
65. Kopp, A., M. Hebecker, E. Svobodova, and M. Jozsi. 2012. Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules* 2: 46-75.
66. Parente, R., S. J. Clark, A. Inforzato, and A. J. Day. 2017. Complement factor H in host defense and immune evasion. *Cell Mol Life Sci* 74: 1605-1624.
67. Weismann, D., K. Hartvigsen, N. Lauer, K. L. Bennett, H. P. Scholl, P. Charbel Issa, M. Cano, H. Brandstatter, S. Tsimikas, C. Skerka, G. Superti-Furga, J. T. Handa, P. F. Zipfel, J. L. Witztum, and C. J. Binder. 2011. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 478: 76-81.
68. Luo, S., S. Poltermann, A. Kunert, S. Rupp, and P. F. Zipfel. 2009. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol* 47: 541-550.
69. Haupt, K., M. Reuter, J. van den Elsen, J. Burman, S. Halbich, J. Richter, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2008. The *Staphylococcus aureus* protein Sbi acts as a complement inhibitor and forms a tripartite complex with host complement Factor H and C3b. *PLoS Pathog* 4: e1000250.
70. Schneider, M. C., R. M. Exley, H. Chan, I. Feavers, Y. H. Kang, R. B. Sim, and C. M. Tang. 2006. Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 176: 7566-7575.
71. Hebecker, M., and M. Jozsi. 2012. Factor H-related protein 4 activates complement by serving as a platform for the assembly of alternative pathway C3 convertase via its interaction with C3b protein. *J Biol Chem* 287: 19528-19536.
72. Goicoechea de Jorge, E., J. J. Caesar, T. H. Malik, M. Patel, M. Colledge, S. Johnson, S. Hakobyan, B. P. Morgan, C. L. Harris, M. C. Pickering, and S. M. Lea. 2013. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4685-4690.
73. Heinen, S., A. Hartmann, N. Lauer, U. Wiehl, H. M. Dahse, S. Schirmer, K. Gropp, T. Enghardt, R. Wallich, S. Halbich, M. Mihlan, U. Schlotzer-Schrehardt, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2009. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 114: 2439-2447.
74. Eberhardt, H. U., D. Buhlmann, P. Hortschansky, Q. Chen, S. Bohm, M. J. Kemper, R. Wallich, A. Hartmann, T. Hallstrom, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2013. Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS One* 8: e78617.

75. Hellwage, J., T. S. Jokiranta, V. Koistinen, O. Vaarala, S. Meri, and P. F. Zipfel. 1999. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* 462: 345-352.
76. Buhlmann, D., H. U. Eberhardt, A. Medyukhina, W. M. Prodinger, M. T. Figge, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2016. FHR3 Blocks C3d-Mediated Coactivation of Human B Cells. *J Immunol* 197: 620-629.
77. Chen, Q., M. Manzke, A. Hartmann, M. Buttner, K. Amann, D. Pauly, M. Wiesener, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2016. Complement Factor H-Related 5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces. *J Am Soc Nephrol* 27: 1413-1425.
78. Csincsi, A. I., Z. Szabo, Z. Banlaki, B. Uzonyi, M. Cserhalmi, E. Karpati, A. Tortajada, J. J. E. Caesar, Z. Prohaszka, T. S. Jokiranta, S. M. Lea, S. Rodriguez de Cordoba, and M. Jozsi. 2017. FHR-1 Binds to C-Reactive Protein and Enhances Rather than Inhibits Complement Activation. *J Immunol* 199: 292-303.
79. McRae, J. L., T. G. Duthy, K. M. Griggs, R. J. Ormsby, P. J. Cowan, B. A. Cromer, W. J. McKinstry, M. W. Parker, B. F. Murphy, and D. L. Gordon. 2005. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J Immunol* 174: 6250-6256.
80. Chen, Q., M. Wiesener, H. U. Eberhardt, A. Hartmann, B. Uzonyi, M. Kirschfink, K. Amann, M. Buettner, T. Goodship, C. Hugo, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2014. Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. *J Clin Invest* 124: 145-155.
81. van Beek, A. E., R. B. Pouw, M. C. Brouwer, G. van Mierlo, J. Geissler, P. Ooijevaar-de Heer, M. de Boer, K. van Leeuwen, T. Rispens, D. Wouters, and T. W. Kuijpers. 2017. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Frontiers in immunology* 8: 1328.
82. Rudnick, R. B., Q. Chen, E. D. Stea, A. Hartmann, N. Papac-Milicevic, F. Person, M. Wiesener, C. J. Binder, T. Wiech, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2018. FHR5 Binds to Laminins, Uses Separate C3b and Surface-Binding Sites, and Activates Complement on Malondialdehyde-Acetaldehyde Surfaces. *J Immunol*.
83. Rudnick, R. 2015. Funktionelle Charakterisierung und Lokalisation von Interaktionsdomänen von Complement Factor H Related Protein 5. *Masterarbeit*.
84. Pedersen, D. V., L. Roumenina, R. K. Jensen, T. A. Gadeberg, C. Marinozzi, C. Picard, T. Rybkine, S. Thiel, U. B. Sorensen, C. Stover, V. Fremeaux-Bacchi, and G. R. Andersen. 2017. Functional and structural insight into properdin control of complement alternative pathway amplification. *EMBO J* 36: 1084-1099.
85. Blatt, A. Z., S. Pathan, and V. P. Ferreira. 2016. Properdin: a tightly regulated critical inflammatory modulator. *Immunol Rev* 274: 172-190.
86. Fearon, D. T., and K. F. Austen. 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of experimental medicine* 142: 856-863.
87. Hourcade, D. E. 2006. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *J Biol Chem* 281: 2128-2132.
88. Csincsi, A. I., A. Kopp, M. Zoldi, Z. Banlaki, B. Uzonyi, M. Hebecker, J. J. Caesar, M. C. Pickering, K. Daigo, T. Hamakubo, S. M. Lea, E. Goicoechea de Jorge, and M. Jozsi. 2015. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. *J Immunol* 194: 4963-4973.
89. Limburg, P. C., and M. Bijl. 2005. Autoantibodies to opsonins of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 64: 1669-1670.
90. Murphy, B., T. Georgiou, D. Machet, P. Hill, and J. McRae. 2002. Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits. *Am J Kidney Dis* 39: 24-27.

91. McRae, J. L., P. J. Cowan, D. A. Power, K. I. Mitchelhill, B. E. Kemp, B. P. Morgan, and B. F. Murphy. 2001. Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J Biol Chem* 276: 6747-6754.
92. Xiao, X., C. Ghossein, A. Tortajada, Y. Zhang, N. Meyer, M. Jones, N. G. Borsa, C. M. Nester, C. P. Thomas, S. R. de Cordoba, and R. J. Smith. 2016. Familial C3 glomerulonephritis caused by a novel CFHR5-CFHR2 fusion gene. *Mol Immunol* 77: 89-96.
93. Gale, D. P., E. G. de Jorge, H. T. Cook, R. Martinez-Barricarte, A. Hadjisavvas, A. G. McLean, C. D. Pusey, A. Pierides, K. Kyriacou, Y. Athanasiou, K. Voskarides, C. Deltas, A. Palmer, V. Fremeaux-Bacchi, S. R. de Cordoba, P. H. Maxwell, and M. C. Pickering. 2010. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet* 376: 794-801.
94. Medjeral-Thomas, N., T. H. Malik, M. P. Patel, T. Toth, H. T. Cook, C. Tomson, and M. C. Pickering. 2014. A novel CFHR5 fusion protein causes C3 glomerulopathy in a family without Cypriot ancestry. *Kidney Int* 85: 933-937.
95. Veneskoski, M., S. P. Turunen, O. Kumm, A. Nissinen, S. Rannikko, A. L. Levonen, and S. Horkko. 2011. Specific recognition of malondialdehyde and malondialdehyde acetaldehyde adducts on oxidized LDL and apoptotic cells by complement anaphylatoxin C3a. *Free Radic Biol Med* 51: 834-843.
96. Binder, C. J., N. Papac-Milicevic, and J. L. Witztum. 2016. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 16: 485-497.
97. Weismann, D., and C. J. Binder. 2012. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2465-2475.
98. Miller, Y. I., S. H. Choi, P. Wiesner, L. Fang, R. Harkewicz, K. Hartvigsen, A. Boullier, A. Gonen, C. J. Diehl, X. Que, E. Montano, P. X. Shaw, S. Tsimikas, C. J. Binder, and J. L. Witztum. 2011. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circulation research* 108: 235-248.
99. Chang, M. K., C. J. Binder, Y. I. Miller, G. Subbanagounder, G. J. Silverman, J. A. Berliner, and J. L. Witztum. 2004. Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory. *The Journal of experimental medicine* 200: 1359-1370.
100. Tsiantoulas, D., T. Perkmann, T. Afonyushkin, A. Mangold, T. A. Prohaska, N. Papac-Milicevic, V. Millischer, C. Bartel, S. Horkko, C. M. Boulanger, S. Tsimikas, M. B. Fischer, J. L. Witztum, I. M. Lang, and C. J. Binder. 2015. Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies. *J Lipid Res* 56: 440-448.
101. Tuma, D. J. 2002. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 32: 303-308.
102. Zipfel, P. F., C. Skerka, Q. Chen, T. Wiech, T. Goodship, S. Johnson, V. Fremeaux-Bacchi, C. Nester, S. R. de Cordoba, M. Noris, M. Pickering, and R. Smith. 2015. The role of complement in C3 glomerulopathy. *Mol Immunol* 67: 21-30.
103. Abrera-Abeleda, M. A., C. Nishimura, J. L. Smith, S. Sethi, J. L. McRae, B. F. Murphy, G. Silvestri, C. Skerka, M. Jozsi, P. F. Zipfel, G. S. Hageman, and R. J. Smith. 2006. Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *J Med Genet* 43: 582-589.
104. Zhai, Y. L., S. J. Meng, L. Zhu, S. F. Shi, S. X. Wang, L. J. Liu, J. C. Lv, F. Yu, M. H. Zhao, and H. Zhang. 2016. Rare Variants in the Complement Factor H-Related Protein 5 Gene Contribute to Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 27: 2894-2905.
105. Seelen, M. A., L. A. Trouw, and M. R. Daha. 2003. Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in nephrology and hypertension* 12: 619-624.

106. Ma, H., D. G. Sandor, and L. H. Beck, Jr. 2013. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 33: 531-542.
107. Micklisch, S., Y. Lin, S. Jacob, M. Karlstetter, K. Dannhausen, P. Dasari, M. von der Heide, H. M. Dahse, L. Schmolz, F. Grassmann, M. Alene, S. Fauser, H. Neumann, S. Lorkowski, D. Pauly, B. H. Weber, A. M. Joussen, T. Langmann, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2017. Age-related macular degeneration associated polymorphism rs10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator. *J Neuroinflammation* 14: 4.
108. Despret, D. D., C. C. Klaver, J. C. Witterman, A. A. Bergen, I. Kardys, M. P. de Maat, S. S. Boekhoorn, J. R. Vingerling, A. Hofman, B. A. Oostra, A. G. Uitterlinden, T. Stijnen, C. M. van Duijn, and P. T. de Jong. 2006. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *Jama* 296: 301-309.
109. Fritsche, L. G., N. Lauer, A. Hartmann, S. Stippa, C. N. Keilhauer, M. Oppermann, M. K. Pandey, J. Kohl, P. F. Zipfel, B. H. Weber, and C. Skerka. 2010. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet* 19: 4694-4704.
110. Choi, H. Y., H. C. Park, and S. K. Ha. 2015. High Water Intake and Progression of Chronic Kidney Diseases. *Electrolyte Blood Press* 13: 46-51.
111. Moell, H. 1956. Size of normal kidneys. *Acta radiol* 46: 640-645.
112. Vaupel, P., H. G. Schaible, and E. Mutschler. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. völlig überarbeitete und erweiterte Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*.
113. Faller, A., M. Schünke, and G. Schünke. Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion. 15., komplett überarbeitete Auflage. *Thieme Verlag*.
114. Schell, C., N. Wanner, and T. B. Huber. 2014. Glomerular development--shaping the multi-cellular filtration unit. *Semin Cell Dev Biol* 36: 39-49.
115. Scott, R. P., and S. E. Quaggin. 2015. Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol* 209: 199-210.
116. Savill, J., J. Smith, C. Sarraf, Y. Ren, F. Abbott, and A. Rees. 1992. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int* 42: 924-936.
117. Schlondorff, D. 1987. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1: 272-281.
118. Schlondorff, D., and B. Banas. 2009. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol* 20: 1179-1187.
119. Arif, E., and D. Nihalani. 2013. Glomerular Filtration Barrier Assembly: An insight. *Postdoc J* 1: 33-45.
120. Suleiman, H., L. Zhang, R. Roth, J. E. Heuser, J. H. Miner, A. S. Shaw, and A. Dani. 2013. Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *Elife* 2: e01149.
121. Miner, J. H. 2012. The glomerular basement membrane. *Experimental cell research* 318: 973-978.
122. McKee, K. K., D. Harrison, S. Capizzi, and P. D. Yurchenco. 2007. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem* 282: 21437-21447.
123. Durbeej, M. 2010. Laminins. *Cell Tissue Res* 339: 259-268.
124. Hohenester, E., and P. D. Yurchenco. 2013. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr* 7: 56-63.
125. Pickering, M. C., V. D. D'Agati, C. M. Nester, R. J. Smith, M. Haas, G. B. Appel, C. E. Alpers, I. M. Bajema, C. Bedrosian, M. Braun, M. Doyle, F. Fakhouri, F. C. Fervenza, A. B. Fogo, V. Fremeaux-Bacchi, D. P. Gale, E. Goicoechea de Jorge, G. Griffin, C. L. Harris, V. M. Holers, S. Johnson, P. J. Lavin, N. Medjeral-Thomas, B. Paul Morgan, C. C. Nast, L. H. Noel, D. K. Peters, S. Rodriguez de Cordoba, A. Servais, S. Sethi, W. C. Song, P. Tamburini, J. M. Thurman, M. Zavros, and

- H. T. Cook. 2013. C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int* 84: 1079-1089.
126. D'Agati, V. D., and A. S. Bomback. 2012. C3 glomerulopathy: what's in a name? *Kidney Int* 82: 379-381.
 127. Welte, T., F. Arnold, J. Kappes, M. Seidl, K. Haffner, C. Bergmann, G. Walz, and E. Neumann-Haefelin. 2018. Treating C3 glomerulopathy with eculizumab. *BMC Nephrol* 19: 7.
 128. Barbour, T. D., M. M. Ruseva, and M. C. Pickering. 2016. Update on C3 glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 31: 717-725.
 129. Barbour, T. D., M. C. Pickering, and H. Terence Cook. 2013. Dense deposit disease and C3 glomerulopathy. *Semin Nephrol* 33: 493-507.
 130. Pickering, M., and H. T. Cook. 2011. Complement and glomerular disease: new insights. *Current opinion in nephrology and hypertension* 20: 271-277.
 131. Tan, Y., and M. H. Zhao. 2018. Complement in glomerular diseases. *Nephrology (Carlton)* 23 Suppl 4: 11-15.
 132. Tortajada, A., H. Yebeles, C. Abarrategui-Garrido, J. Anter, J. M. Garcia-Fernandez, R. Martinez-Barricarte, M. Alba-Dominguez, T. H. Malik, R. Bedoya, R. Cabrera Perez, M. Lopez Trascasa, M. C. Pickering, C. L. Harris, P. Sanchez-Corral, O. Llorca, and S. Rodriguez de Cordoba. 2013. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J Clin Invest* 123: 2434-2446.
 133. Malik, T. H., P. J. Lavin, E. Goicoechea de Jorge, K. A. Vernon, K. L. Rose, M. P. Patel, M. de Leeuw, J. J. Neary, P. J. Conlon, M. P. Winn, and M. C. Pickering. 2012. A hybrid CFHR3-1 gene causes familial C3 glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 23: 1155-1160.
 134. Togarsimalemath, S. K., S. K. Sethi, R. Duggal, M. L. Quintrec, P. Jha, R. Daniel, F. Gonnet, S. Bansal, L. T. Roumenina, V. Fremeaux-Bacchi, V. Kher, and M. A. Dragon-Durey. 2017. A novel CFHR1-CFHR5 hybrid leads to a familial dominant C3 glomerulopathy. *Kidney Int*.
 135. Palinski, W., S. Horkko, E. Miller, U. P. Steinbrecher, H. C. Powell, L. K. Curtiss, and J. L. Witztum. 1996. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest* 98: 800-814.
 136. Chou, M. Y., L. Fogelstrand, K. Hartvigsen, L. F. Hansen, D. Woelkers, P. X. Shaw, J. Choi, T. Perkmann, F. Backhed, Y. I. Miller, S. Horkko, M. Corr, J. L. Witztum, and C. J. Binder. 2009. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* 119: 1335-1349.
 137. Chen, Q. 2014. Autoantibodies and a factor H-related hybrid protein deregulate complement in dense deposit disease. *Dissertation*.
 138. Senftleben, U. 2015. Rolle des CFHR5 Proteins bei der Pathogenese der C3-Glomerulopathie. *Dissertation*.
 139. Matthes, J. 2017. Charakterisierung der Bindung von humanen Serumproteinen an das Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd-Acetaldehyd (MAA). *Bachelorarbeit*.
 140. Papac-Milicevic, N., C. J. Busch, and C. J. Binder. 2016. Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. *Adv Immunol* 131: 1-59.
 141. Katschke, K. J., Jr., H. Xi, C. Cox, T. Truong, Y. Malato, W. P. Lee, B. McKenzie, R. Arceo, J. Tao, L. Rangell, M. Reichelt, L. Diehl, J. Elstrott, R. M. Weimer, and M. van Lookeren Campagne. 2018. Classical and alternative complement activation on photoreceptor outer segments drives monocyte-dependent retinal atrophy. *Sci Rep* 8: 7348.

142. Marder, S. R., D. E. Chenoweth, I. M. Goldstein, and H. D. Perez. 1985. Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. *J Immunol* 134: 3325-3331.
143. Li, M., P. W. Peake, J. A. Charlesworth, D. J. Tracey, and G. Moalem-Taylor. 2007. Complement activation contributes to leukocyte recruitment and neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 26: 3486-3500.
144. de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine* 174: 1209-1220.
145. van der Bruggen, T., S. Nijenhuis, E. van Raaij, J. Verhoef, and B. S. van Asbeck. 1999. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* 67: 3824-3829.
146. Athanasiou, Y., K. Voskarides, D. P. Gale, L. Damianou, C. Patsias, M. Zavros, P. H. Maxwell, H. T. Cook, P. Demosthenous, A. Hadjisavvas, K. Kyriacou, I. Zouvani, A. Pierides, and C. Deltas. 2011. Familial C3 glomerulopathy associated with CFHR5 mutations: clinical characteristics of 91 patients in 16 pedigrees. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 1436-1446.
147. Medjeral-Thomas, N. R., H. J. Lomax-Browne, H. Beckwith, M. Willicombe, A. G. McLean, P. Brookes, C. D. Pusey, M. Falchi, H. T. Cook, and M. C. Pickering. 2017. Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 92: 942-952.
148. Park, C. T., and S. D. Wright. 1996. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J Biol Chem* 271: 18054-18060.
149. Tortajada, A., E. Gutierrez, E. Goicoechea de Jorge, J. Anter, A. Segarra, M. Espinosa, M. Blasco, E. Roman, H. Marco, L. F. Quintana, J. Gutierrez, S. Pinto, M. Lopez-Trascasa, M. Praga, and S. Rodriguez de Cordoba. 2017. Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int* 92: 953-963.
150. Lauer, N., M. Mihlan, A. Hartmann, U. Schlotzer-Schrehardt, C. Keilhauer, H. P. Scholl, P. Charbel Issa, F. Holz, B. H. Weber, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2011. Complement regulation at necrotic cell lesions is impaired by the age-related macular degeneration-associated factor-H His402 risk variant. *J Immunol* 187: 4374-4383.
151. Zipfel, P. F., S. Heinen, M. Jozsi, and C. Skerka. 2006. Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol* 43: 97-106.
152. Haines, J. L., M. A. Hauser, S. Schmidt, W. K. Scott, L. M. Olson, P. Gallins, K. L. Spencer, S. Y. Kwan, M. Noureddine, J. R. Gilbert, N. Schnetz-Boutaud, A. Agarwal, E. A. Postel, and M. A. Pericak-Vance. 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308: 419-421.
153. Lin, Y., S. Irmischer, and C. Skerka. 2019. Monitoring Surface Reactions by Combined Western Blot-ELISA Analysis. *Methods in molecular biology* 1834: 75-83.
154. Koch, T. K., M. Reuter, D. Barthel, S. Bohm, J. van den Elsen, P. Kraiczy, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2012. Staphylococcus aureus proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b. *PLoS One* 7: e47638.
155. Merle, N. S., S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. 2015. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in immunology* 6: 262.

156. Rabasco-Ruiz, C., A. Huerta-Arroyo, J. Caro-Espada, E. Gutierrez-Martinez, and M. Praga-Terente. 2013. C3 glomerulopathies. A new perspective on glomerular diseases. *Nefrologia* 33: 164-170.
157. Senders, M. L., X. Que, Y. S. Cho, C. Yeang, H. Groenen, F. Fay, C. Calcagno, A. E. Meerwaldt, S. Green, P. Miu, M. E. Lobatto, T. Reiner, Z. A. Fayad, J. L. Witztum, W. J. M. Mulder, C. Perez-Medina, and S. Tsimikas. 2018. PET/MR Imaging of Malondialdehyde-Acetaldehyde Epitopes With a Human Antibody Detects Clinically Relevant Atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 71: 321-335.
158. Chew, C., and R. Lennon. 2018. Basement Membrane Defects in Genetic Kidney Diseases. *Front Pediatr* 6: 11.
159. Miner, J. H. 2011. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol* 26: 1413-1417.
160. Goldberg, S., T. L. Adair-Kirk, R. M. Senior, and J. H. Miner. 2010. Maintenance of glomerular filtration barrier integrity requires laminin alpha5. *J Am Soc Nephrol* 21: 579-586.
161. Sethi, S., J. D. Gamez, J. A. Vrana, J. D. Theis, H. R. Bergen, 3rd, P. F. Zipfel, A. Dogan, and R. J. Smith. 2009. Glomeruli of Dense Deposit Disease contain components of the alternative and terminal complement pathway. *Kidney Int* 75: 952-960.
162. Aumailley, M., and N. Smyth. 1998. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 193 (Pt 1): 1-21.
163. Duner, P., F. To, K. Berg, R. Alm, H. Bjorkbacka, D. Engelbertsen, G. N. Fredrikson, J. Nilsson, and E. Bengtsson. 2010. Immune responses against aldehyde-modified laminin accelerate atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice. *Atherosclerosis* 212: 457-465.
164. Duner, P., F. To, R. Alm, I. Goncalves, G. N. Fredrikson, B. Hedblad, G. Berglund, J. Nilsson, and E. Bengtsson. 2009. Immune responses against fibronectin modified by lipoprotein oxidation and their association with cardiovascular disease. *J Intern Med* 265: 593-603.
165. Wu, F., Q. Zou, X. Ding, D. Shi, X. Zhu, W. Hu, L. Liu, and H. Zhou. 2016. Complement component C3a plays a critical role in endothelial activation and leukocyte recruitment into the brain. *J Neuroinflammation* 13: 23.
166. Guillems, M., A. Mildner, and S. Yona. 2018. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49: 595-613.
167. Udalova, I. A., A. Mantovani, and M. Feldmann. 2016. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12: 472-485.
168. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.
169. Sampath, P., K. Moideen, U. D. Ranganathan, and R. Bethunaickan. 2018. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Frontiers in immunology* 9: 1726.
170. Dale, D. C., L. Boxer, and W. C. Liles. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935-945.
171. Irmischer, S., S. Brix, S. L. H. Zipfel, L. D. Halder, S. Mutlutürk, S. Wulf, E. Girdauskas, H. Reichensperner, R. A. K. Stahl, B. Jungrnickel, T. Wiech, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2019. Serum FHR1 binding to necrotic-type cells activates monocytic inflammasome and marks necrotic sites in vasculopathies. *Nature Communications (accepted)*.
172. Khera, R., and N. Das. 2009. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol* 46: 761-772.
173. Ehlenberger, A. G., and V. Nussenzweig. 1977. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 145: 357-371.

174. Kemper, C., L. M. Mitchell, L. Zhang, and D. E. Hourcade. 2008. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9023-9028.
175. Abbasi, M., G. Chertow, and Y. Hall. 2010. End-stage Renal Disease. *Am Fam Physician* 82: 1512.
176. Cosio, F. G., D. D. Sedmak, J. D. Mahan, and N. S. Nahman, Jr. 1989. Localization of decay accelerating factor in normal and diseased kidneys. *Kidney Int* 36: 100-107.
177. Nakanishi, I., A. Moutabarrik, T. Hara, M. Hatanaka, T. Hayashi, T. Syouji, N. Okada, E. Kitamura, Y. Tsubakihara, M. Matsumoto, and et al. 1994. Identification and characterization of membrane cofactor protein (CD46) in the human kidneys. *Eur J Immunol* 24: 1529-1535.
178. Shibata, T., F. G. Cosio, and D. J. Birmingham. 1991. Complement activation induces the expression of decay-accelerating factor on human mesangial cells. *J Immunol* 147: 3901-3908.
179. Shibata, T., and T. Kohsaka. 1995. Effects of complement activation on the expression of CD59 by human mesangial cells. *J Immunol* 155: 403-409.
180. Scindia, Y. M., U. S. Deshmukh, and H. Bagavant. 2010. Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 1337-1343.
181. Brown, Z., R. M. Strieter, S. W. Chensue, M. Ceska, I. Lindley, G. H. Neild, S. L. Kunkel, and J. Westwick. 1991. Cytokine-activated human mesangial cells generate the neutrophil chemoattractant, interleukin 8. *Kidney Int* 40: 86-90.
182. Ruef, C., K. Budde, J. Lacy, W. Northemann, M. Baumann, R. B. Sterzel, and D. L. Coleman. 1990. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int* 38: 249-257.
183. Liang, Y., J. Zhang, Y. Zhou, G. Xing, G. Zhao, and Z. Liu. 2015. Proliferation and Cytokine Production of Human Mesangial Cells Stimulated by Secretory IgA Isolated from Patients with IgA Nephropathy. *Cell Physiol Biochem* 36: 1793-1808.
184. Bomback, A. S., R. J. Smith, G. R. Barile, Y. Zhang, E. C. Heher, L. Herlitz, M. B. Stokes, G. S. Markowitz, V. D. D'Agati, P. A. Canetta, J. Radhakrishnan, and G. B. Appel. 2012. Eculizumab for dense deposit disease and C3 glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 748-756.
185. Le Quintrec, M., A. L. Lapeyraque, A. Lionet, A. L. Sellier-Leclerc, Y. Delmas, V. Baudouin, E. Daugas, S. Decramer, L. Tricot, M. Cailliez, P. Dubot, A. Servais, C. Mourey-Epron, F. Pourcine, C. Loirat, V. Fremeaux-Bacchi, and F. Fakhouri. 2018. Patterns of Clinical Response to Eculizumab in Patients With C3 Glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 72: 84-92.
186. Zipfel, P. F., T. Wiech, R. B. Rudnick, S. Afonso, C. Skerka, and F. J. Person. 2019. Complement Inhibitors in Clinical Trials for Glomerular Diseases. *Frontiers in immunology* Under Review.
187. Harris, C. L., R. B. Pouw, D. Kavanagh, R. Sun, and D. Ricklin. 2018. Developments in anti-complement therapy; from disease to clinical trial. *Mol Immunol* 102: 89-119.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit vermerkt.

Alle Personen die mich bei der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind von mir benannt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Zudem erhielten von mir keine Dritten unmittelbare oder mittelbar geldwerte Leistungen, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Von mir wurde keine identische oder abgeänderte Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 20. Juni 2019

Ramona Rudnick

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ramona Rudnick, M. Sc.
Geburtsdatum: 12.01.1991
Geburtsort: Naila
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Bildungsweg

Seit 01/2016 **Promotionsstudium**
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Jena
Abteilung Infektionsbiologie

10/2013 – 12/2015 **Masterstudiengang Biochemistry**
Master of Science (Abschlussnote: 1,1)
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Masterarbeit
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie Jena
Abteilung Infektionsbiologie

10/2010 – 08/2013 **Bachelorstudiengang Ernährungswissenschaften**
Bachelor of Science (Abschlussnote: 1,3)
Friedrich-Schiller-Universität Jena

09/2001 – 06/2010 **Allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote: 1,9)**
Schiller-Gymnasium Hof

Publikationen, Konferenzbeiträge, Auszeichnungen

Publikationen

FHR5 binds to Laminins, Uses Separate C3b and Surface-Binding Sites, and Activates Complement on Malondialdehyde-Acetaldehyde Surfaces

Rudnick RB, Chen Q, Stea ED, Hartmann A, Papac-Milicevic N, Person F, Wiesener M, Binder CJ, Wiech T, Skerka C, Zipfel PF

J Immunol (2018) 200(7):2280–90. doi:10.4049/jimmunol.1701641

Ongoing Clinical Trials with Complement Inhibitors in Glomerular Diseases

Zipfel PF, Wiech T, Rudnick RB, Afonso S, Skerka C, Person FJ

Front Immunol (in revision)

VARIANTS WITHIN CFH, CFHR1 AND CFHR3 GENES INFLUENCE CFH BINDING TO MDA MODIFIED SURFACES

Papac-Milicevic N, Alic L, Czamara D, Gurbisz M, Ozsvar-Kozma, Hoermann G, Rudnick RB, Hartmann A, Hasslinger-Hutter S, Skerka C, Zipfel PF, Binder EB, Binder CJ

(in Vorbereitung)

Pathophysiologie der C3-Glomerulopathie

Rudnick RB und Zipfel PF

Nieren- und Hochdruckkrankheiten (in Vorbereitung)

Vorträge

12. ILRS Symposium, Mai 2019, Wittenberg (Deutschland)

FHR5 can amplify renal damage – how the good guy is misused in kidney disease

11. ILRS Symposium, Mai 2018, Jena (Deutschland)

FHR5 activates complement on malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) surfaces

08. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, September 2016, Berlin (Deutschland)

Identifizierung neuer Interaktionsdomänen von Complement Factor H Related Protein 5

Posterpräsentationen

10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, September 2018, Berlin (Deutschland)

FHR5 aktiviert das Komplementsystem auf Laminin-Oberflächen

27th International Complement Workshop, September 2018, Santa Fe (NM, USA)

Factor-H-Related-Protein-5 activates complement on modified host surfaces and modulates cellular responses

SFB 1192 Retreat, Mai 2018, Imperia (Italien)

FHR5 activates complement on laminin surfaces

09. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, September 2017, Mannheim (Deutschland)

Das C3-Glomerulopathie-assoziierte Protein CFHR5 bindet über oxidationsspezifische Epitope an modifizierte humane Endothelzellen

16th European Meeting on Complement in Human Disease, September 2017, Kopenhagen (Dänemark)

The C3-glomerulopathy associated protein CFHR5 binds to modified human endothelial cells via oxidation specific epitopes

(Reisekostenzuschuss durch die Deutsche Gesellschaft für Immunologie)

08. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, September 2016, Berlin (Deutschland)

Identifizierung neuer Interaktionsdomänen von Complement Factor H Related Protein 5

Auszeichnungen

Vortragspreis (Mai 2018)

11th ILRS Symposium

Posterpreis (September 2016)

8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

Bachelorarbeitspreis 2014 (September 2014)

APFEL e.V. – Friedrich-Schiller-Universität Jena

Danksagung

Jetzt sitze ich also tatsächlich hier und schreibe die Danksagung meiner Doktorarbeit und das fühlt sich ziemlich surreal an. Mir ist dieser Teil extrem wichtig, denn ohne die direkte und indirekte Unterstützung vieler Menschen, wäre diese Arbeit nicht entstanden. Und dafür möchte ich euch allen von Herzen danken!

Zu Beginn möchte ich mich natürlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Zipfel bedanken. Ich danke dir, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast, an diesem spannenden Thema zu forschen und dass du von Anfang an daran geglaubt hast, dass ich in der Lage sein werde, ein solches Projekt zu bearbeiten. Ich danke dir für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, für die Hilfe und Unterstützung bei der Entwicklung dieser Arbeit und dafür, dass ich an so vielen nationalen und internationalen Konferenzen teilnehmen und meine Ergebnisse dort präsentieren durfte. Das hat mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich extrem vorangebracht. Ich möchte dir ebenso dafür danken, dass du mich in der schwierigsten Phase dieser Arbeit unterstützt hast und ich so daran wachsen konnte! Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Christine Skerka für die konstruktiven Diskussionen bedanken, die mir stets neuen Input gegeben haben und mich zu neuen Sichtweisen hinsichtlich meines Projekts motiviert haben. Mein Dank gilt ebenso allen Kooperationspartnern, ohne die meine Arbeit in dieser Art nicht möglich gewesen wäre. Vor allem danke ich Prof. Dr. Thorsten Wiech, Dr. Fermín Person und Norbert Niebuhr aus Hamburg für die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen sowie die konstruktiven Meetings im In- und Ausland. Außerdem danke ich natürlich Prof. Dr. Christoph Binder und Dr. Nikolina Papac-Milicevic aus Wien für die Bereitstellung der MAA-Addukte, die Durchführung ergänzender Experimente und die zahlreichen Ratschläge und Tipps.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der wunderbaren Arbeitsgruppe Infektionsbiologie bedanken <3 Die Zeit mit euch war einfach unglaublich schön und ich hätte mir wirklich keine besseren Kollegen als euch wünschen können.

Dr. Hans-Martin Dahse und Eva-Maria Neumann danke ich für die Unterstützung rund um die Zellkultur. Danke an Laura Broschat und Alexandra Rülke für die Hilfe bei der Proteinaufreinigung. Bei Ina Löschmann und Monika von der Heide bedanke ich mich für alle Tipps rund um den Laboralltag. Meinen Bachelorstudenten Julian Matthes und Anna Melekhova danke ich für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit, sie während ihrer Arbeit zu betreuen. Dr. Sarah Irmischer und Luke Donald Halder danke ich für die Zusammenarbeit und die Ratschläge bei der Monozytenaufreinigung. Furthermore, I would like to thank Dr. Prasad Dasari, Dr. Emma Diletta Stea, Dr. Sara Afonso, Vidushi Madaan, Mahmoud Abdel Fatah, Naile Koleci and Sibel Mutlutürk. I'm grateful that you all were part of this exciting journey. You introduced me into your culture and traditions and helped me to expand my horizon in so many ways. Thank you all! Gracias Susana Hidalgo Vico! I'm just so so happy that our ways crossed each other. You're simply one of the most inspiring people.

Ich danke außerdem besonders Heike Gäbler und zwar nicht nur für die Hilfe bei organisatorischen Dingen, sondern auch für all die lustigen (und davon gab es viele!), ernsten und lehrreichen Momente sowie für die vertrauten Gespräche während der letzten Jahre. Dr. Justus Linden, Dr. Anika Westphal, Dr. Susanne Ackermann, Isabel Auge und Sarah Kröller möchte ich ebenfalls ganz besonders danken. Ihr seid wirklich wichtige Menschen für mich geworden. Und egal was war, ich wusste immer, dass ich auf euch zählen konnte. Und danke natürlich für all die TCKY-Abende mit denen wir Erfolge und Misserfolge zelebriert haben ;-). Dann möchte ich mich noch bei zwei weiteren besonderen Menschen bedanken und zwar bei Andrea Hartmann und Nadine Reiher. Andrea, danke, dass ich dich stets und ständig mit allen Fragen rund um den Laboralltag nerven durfte, dass du mir immer geholfen hast, Erfahrungen und Material geteilt hast, dass du mir zugehört hast

und mich während dieser ganzen Zeit unglaublich unterstützt hast. Du bist mir ein großes Vorbild in so vielen Dingen geworden. Nadine, eigentlich bräuchte ich jetzt noch eine extra Seite. Ich glaube nämlich, dass einen wenig so sehr zusammenschweißt wie die gemeinsame Doktorarbeit-Zeit und es gibt nicht viele Menschen, die mich so sehr verstehen wie du. Ich danke dir, dass du immer ein offenes Ohr für meine Probleme hattest, sei es wissenschaftlich oder privat. Danke, dass du mir während meiner schweren Phase beigestanden und mich unterstützt und aufgebaut hast. Danke, dass wir so viel voneinander gelernt haben, für dein ehrliches Feedback, für die Bürogemeinschaft, für unseren Laboralltag, für Konferenzen, für Madrid und für so vieles mehr. Kurzum: Danke für deine Freundschaft!

Ich danke außerdem meiner sehr guten Freundin Melanie Kahl. Wir haben im Laufe des Studiums und der Doktorarbeit wirklich viel zusammen durchgestanden und ich danke dir einfach unglaublich für deine Freundschaft und dafür, dass du einfach immer da bist, wenn ich dich brauche. Außerdem möchte ich bei Carina Hackenberg bedanken. Danke Carinski für alle Jumpings, für Seerunden, für Duschbiere, für Tee- und Manda-Abende und so vieles mehr. Egal wie sehr mich gescheiterte Experimente oder schlechte Ergebnisse runtergezogen haben, ein Wochenende in Tauperlitz mit dir hat immer geholfen.

Und auch wenn es vielleicht ein bisschen ungewöhnlich ist, möchte ich an dieser Stelle gerne der Band Heaven Shall Burn danken, weil mir deren Musik vor allem während der schwierigsten Zeit meiner Doktorarbeit extrem dabei geholfen hat, mich zu fokussieren und weiterzumachen anstatt aufzugeben. Getreu dem Motto „*Keep listening to music. It gets you through everything*“ (Mitch Lucker).

Anschließend möchte ich mich in besonderem Maß bei meinem Freund Benjamin Schorr bedanken. Danke, dass du mich während dieser ganzen Zeit immer unterstützt hast! Danke, dass ich dir immer alles erzählen konnte, danke für deine Geduld und dein Verständnis und danke, dass ich das Labor und die Arbeit zu Hause auch einfach mal vergessen konnte. Ebenso möchte ich Katrin Schorr danken. Dein Verständnis für das wissenschaftliche Arbeiten und deine aufbauenden Worte haben mir immer gut getan.

Mein abschließender und unendlicher Dank gilt meiner Familie, ohne die ich es niemals soweit geschafft hätte. Ich danke zunächst meinen Großeltern Margit und Wiegand Schrepfer. Danke, dass ihr mich immer so großzügig unterstützt habt und dass ihr mir immer ein Gefühl von Unbeschwertheit gebt. Ich danke außerdem aus tiefstem Herzen meinen Eltern Ulla und Lutz Rudnick und meinem Bruder Dr. Alexander Rudnick. Danke Mama und Papa, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Danke, dass ihr mir immer den Rücken stärkt und danke für eure Liebe, Zeit und Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Alex, dir danke ich auch für so ziemlich alles. Seit ich denken kann, bist du in so vielen Dingen mein Vorbild gewesen und natürlich, wie soll's anders sein, auch bei der Doktorarbeit. Ich danke dir so sehr dafür, dass du mich einfach immer verstehst. Dafür, dass ich dich immer nerven darf, ich immer auf dich zählen kann und natürlich dafür, dass wir stundenlang Jürgen-hörend zu Konzerten fahren. Weil das hilft in jeder Lebenslage! :)